

**Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular**

**ANÁLISIS DE LOS REQUERIMIENTOS
DE LA REPLICACIÓN DEPENDIENTE
DE RECOMBINACIÓN EN EL
BACTERIÓFAGO SPP1**

TESIS DOCTORAL

Ambra Lo Piano



**Centro Nacional de Biotecnología
Consejo Superior de Investigación Científica
Madrid, 2013**



ANÁLISIS DE LOS REQUERIMIENTOS DE LA REPLICACIÓN DEPENDIENTE DE RECOMBINACIÓN EN EL BACTERIÓFAGO SPP1

Ambra Lo Piano

Memoria presentada para optar al título de Doctor en Biología
Molecular

Director de Tesis: Dr. Juan Carlos Alonso

Codirector de Tesis: Silvia Ayora Hirsch

Madrid, Mayo 2013

ABSTRACT

Bacillus subtilis bacteriophage SPP1 replication is tightly coupled to DNA recombination. SPP1 replication initiates by a theta mechanism in one of the two replication origins (*oriR* and *oriL*), but how it shifts to late replication, where concatemeric DNA synthesis takes place, is undetermined. Bacteriophage SPP1 transcribes a number of genes involved in theta replication and recombination-dependent replication at early times after infection from early promoter 2 (PE₂) and 3 (PE₃), respectively.

In this work we established the requirements for initiation of concatemeric DNA replication, which is an origin-dependent event, might initiate at any of the two replication origins (*oriL* or *oriR*), provided that there is a replication block. The replication fork stalling, due probably to the barrier formed by G38P tightly bound to one of the origins of replication, might be followed by a replication fork reversal mechanism. Here, the annealing of the nascent leading- and lagging-strand ends creates a Holliday junction (HJ). The data presented here demonstrate that the product of gene 44 (G44P, 27.5 KDa) which is a dimer in solution, binds specifically and with high affinity to several DNA recombination intermediates, but cleaves preferentially Holliday junctions and replicated D-loops. These data suggest a role for this enzyme in the shift from theta to concatemeric viral replication. G44P might provide the proper substrate for phage-encoded recombination proteins (G35P [a genuine recombinase], and G34.IP [a 5' to 3' exonuclease]) to catalyze the formation of a D-loop intermediate that is then the substrate required for assembly of a new replication fork with the subsequent replication re-start and concatemeric DNA synthesis. This process seems to be independent on host-recombination proteins.

When duplex DNA is altered in almost any way (replicated, recombined or repaired), single stranded DNA is usually formed and single-stranded DNA binding proteins are present. SPP1 can use for DNA replication both host (SsbA) and viral SSBs (G36P). We have investigated the role of G36P as an organizer of replication and recombination complexes, and the role of the carboxy-terminal domain of G36P (G36P_{Cter}) in protein-protein interaction. The interactome of G36P includes at least 5 proteins, coded by the host or the phage. The interactome was previously shown to include G35P and G40P and is extended in this study by the demonstration of the interaction of G36P with G38P, τ subunit of DNA polymerase holoenzyme and G44P. Most, if not all, of these interactions are not mediated by the amphipathic C-terminus of G36P. The C-terminal domain G36P is not required for the tetramerization of the protein and for binding to ssDNA. However, G36P_{Cter} has an effect on the stability of the G36P-ssDNA complex. Also we show that this domain is required for replication fork progress using an *in vitro* replication system..

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La replicación del DNA en procariotas	1
1.1.1 El comienzo de la replicación en <i>Escherichia coli</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	1
1.1.2 La elongación de la replicación	4
1.1.3 La proteína SSB	5
1.1.4 Re-ensamblado de la horquilla de replicación	7
1.2 El bacteriófago SPP1	9
1.2.1 El comienzo de la replicación en SPP1: la replicación tipo θ	11
1.2.2 La replicación concatémica en SPP1	14
1.3 La replicación concatémica en otros virus	18
1.3.1 RDR en otros virus con genoma circular	19
a) El bacteriófago λ	19
b) Herpes simplex virus tipo I (HSV-I)	20
1.3.2 RDR en virus con genoma lineal	20
a) El bacteriófago T4	20
1.4 Resolvasas de estructuras de Holliday de bacteriófagos	21
a) RusA y Rap	22
b) Endo VII	23
c) Endo I	23
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 Materiales	27
a) Cepas	27
b) Reactivos y materiales	27
c) Tampones	30
3.2 Métodos	30
3.2.1 Manipulación de células	30
a) Obtención de células competentes	30
b) Transformación bacteriana	31
c) Infección de <i>B. subtilis</i> con SPP1	31
d) Transducción con SPP1	31
3.2.2 Manipulación del DNA	32
a) Purificación y cuantificación del DNA	32
b) Marcaje radioactivo de DNA	34
c) Obtención de DNA de doble cadena y estructuras de Holliday sintéticas	34
d) Mutagénesis dirigida	35
3.2.3 Obtención de proteínas	36
a) Sobreexpresión de proteínas	36
b) Purificación de proteínas	37
3.2.4 Ensayos <i>in vivo</i>	39
a) Replicación de los plásmidos, Southern blot y cuantificación	39
b) Inmunodetección de la expresión de la proteína G44P <i>in vivo</i>	40
3.2.5 Ensayos <i>in vitro</i>	40

a) Interacción proteína-DNA	40
b) Interacción proteína-proteína	43
4. RESULTADOS	45
4.1 Papel de los orígenes de replicación en RDR	45
4.1.1 <i>G38P une in vitro oriL y oriR y los aparea.</i>	45
4.1.2 <i>La replicación de alto peso molecular requiere un origen de replicación in vivo</i>	47
4.1.3 <i>La replicación de alto peso molecular requiere las proteínas virales G35P y G38P</i>	52
4.1.4 <i>La replicación de alto peso molecular se dispara tras la rotura de la doble cadena de DNA</i>	54
4.2 Análisis Bioquímico	57
4.2.1 <i>La proteína G36P</i>	57
4.2.2 <i>Construcción y purificación de mutantes de delección de la proteína G36P</i>	59
4.2.3 <i>Capacidad de unión a DNAs de los mutantes de delección de G36P</i>	60
4.2.4 <i>Papel de la región C-terminal en la estabilidad del complejo DNAs-G36P</i>	62
4.2.5 <i>Interacción de G36P y de $\Delta C21$-G36P con proteínas del replisoma de SPP1.</i>	63
4.2.6 <i>Interacción entre las proteína G36P y las proteínas de recombinación del fago: G34.1P, G44P y G35P</i>	72
4.2.7 <i>Construcción y purificación de los mutantes puntuales de G35P</i>	76
4.2.8 <i>Unión a DNA de las variantes de G35P</i>	79
4.2.9 <i>Las variantes de G35P catalizan la reacción de anillamiento</i>	82
4.2.10 <i>Análisis de la interacción de G36P con las variantes de G35P</i>	83
4.2.11 <i>G36P facilita la unión de G35P a DNA de cadena sencilla</i>	85
4.2.12 <i>Las proteínas G35P y G36P forman sobre el DNA de cadena sencilla complejos independientes</i>	87
4.2.13 <i>G36P inhibe la reacción de anillamiento catalizada por G35P</i>	89
4.3 Caracterización de la proteína G44P	91
4.3.1 <i>Clonaje y purificación de G44P</i>	94
4.3.2 <i>G44P une intermedios de recombinación</i>	95
4.3.3 <i>G44P resuelve estructuras de Holliday</i>	96
4.3.4 <i>G44P resuelve bucles-D replicados</i>	98
5. DISCUSIÓN	101
5.1 El comienzo de la replicación en SPP1	101
5.2. El cambio de replicación de tipo θ a tipo σ	102
5.3. Proteínas de recombinación de SPP1 implicadas en replicación	105
5.3.1 <i>La proteína G36P</i>	105
5.3.2 <i>La proteína G35P</i>	109
5.4 El modelo de inicio de la replicación concatémica	116
6. CONCLUSIONES	119
7. BIBLIOGRAFIA	121

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. El comienzo de la replicación en <i>E. coli</i> .	3
Figura 2. Esquema del cargado de la helicasa DnaB dependiente del control de PriA en <i>E. coli</i> .	8
Figura 3. El cromosoma de SPP1	10
Figura 4. Modelo de la interacción de τ con el replisoma.	14
Figura 5. Modelos de iniciación de la replicación concatémica en SPP1.	18
Figura 6. Modelo de RDR del bacteriófago T4.	21
Figura 7. Estructuras de DNA construidas en este trabajo.	34
Figura 8. Visualización mediante microscopía electrónica de la unión de G38P a las regiones <i>oriL</i> y <i>oriR</i>	46
Figura 9. Las proteínas de replicación del fago SPP1 no replican el plásmido pBT233	48
Figura 10. Las proteínas de replicación del fago SPP1 replican el plásmido pBT233- <i>oriR</i> y el plásmido pBT233- <i>oriL</i>	50
Figura 11. Cuantificación en Unidades Arbitrarias (AU) de DNA plasmídico de alto peso molecular obtenido en las cepas <i>wt</i> -pBT233- <i>oriR</i> , <i>wt</i> -pBT233- <i>oriL</i> , <i>dnaB</i> -pBT233- <i>oriR</i> y <i>dnaB</i> -pBT233- <i>oriL</i> tras la infección con SPP1 (moi 10) a 50°C	51
Figura 12. La maquinaria de replicación de SPP1 requiere una región <i>ori</i> para ensamblar una replicación de alto peso molecular.	52
Figura 13. La replicación de alto peso molecular del plásmido pBT233- <i>oriR</i> requiere las proteínas G35P y G38P.	53
Figura 14. La replicación de alto peso molecular del plásmido pBT233- <i>oriL</i> requiere las proteínas G35P y G38P.	54
Figura 15. La rotura de la doble cadena de DNA dispara la replicación de alto peso molecular mediada por proteínas virales	56
Figura 16. Alineamiento de la proteína G36P de SPP1 con las proteínas SsbA de <i>B. subtilis</i> y SSB de <i>E. coli</i> (obtenido mediante el programa Boxshade).	57
Figura 17. Estado oligomérico de la proteína G36P.	58
Figura 18. Purificación de los mutantes de delección de la proteína G36P	59
Figura 19. Estado oligomérico de los mutantes de delección de la proteína G36P.	60
Figura 20. Unión de G36P a DNAs de 114 nt	61
Figura 21. Unión de G36P- Δ C21 a DNAs [γ^{32} P] 114nt	62
Figura 22. Estabilidad del complejo DNA-proteína	63
Figura 23. Control de ensayos de precipitación.	65
Figura 24. El dominio C-terminal de G36P no se requiere para la interacción con G40P	66
Figura 25. G36P podría interaccionar débilmente con G38P a través del dominio C-terminal.	67
Figura 26. G36P y G39P no interaccionan <i>in vitro</i> .	68
Figura 27. G36P no interacciona con DnaG	69
Figura 28. G36P interacciona con τ <i>in vitro</i> .	70
Figura 29. El dominio C-terminal de G36P se requiere en la replicación <i>in vitro</i> establecida con proteínas purificadas de SPP1 y proteínas de su hospedador	72
Figura 30. G34.1P precipita sola al 37% de saturación de sulfato amónico	73
Figura 31. G36P y G35P coprecipitan en presencia de 1,8 M de sulfato amónico.	74
Figura 32. Los mutantes de delección de G36P interaccionan con G35P.	75
Figura 33. G36P y G44P interaccionan <i>in vitro</i> .	76
Figura 34. Alineamiento de la proteína G35P con otras proteínas que pertenecen a la familia RecT (Boxshade)	77

Figura 35. Unión a cadena sencilla de G35P.	79
Figura 36. Unión a cadena sencilla de los mutantes de G35P	80
Figura 37. Unión a cadena doble de la proteína G35P y sus variantes.	81
Figura 38. Reacción de anillamiento,	83
Figura 39. Cuantificación de la cantidad relativa de las variantes de G35P en la precipitación con sulfato amónico en presencia y en ausencia de G36P.	84
Figura 40. Unión de G36P y G35P a DNAs 114nt marcado radioactivamente	85
Figura 41. Unión de G36P-ΔC21 y G35P al DNAs.	86
Figura 42. G35P y G36P forman sobre DNA de cadena sencilla dos complejos independientes.	88
Figura 43. Reacción de anillamiento en presencia de G35P y G36P	89
Figura 44. Secuencia correcta del gen 44 y detección <i>in vivo</i> de la síntesis de G44P tras la infección con SPP1	93
Figura 45. Purificación de G44P y determinación de la masa molecular por cromatografía en filtración en gel.	94
Figura 46. G44P une diferentes sustratos	95
Figura 47. Determinación de la actividad de corte de G44P sobre estructuras de Holliday estáticas y móviles.	97
Figura 48. Actividad de corte de intermediarios de recombinación catalizada por G44P	99
Figura 49. Modelos de iniciación de la replicación concatémica en SPP1.	117

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Cepas	27
Tabla 2. Reactivos	27
Tabla 3. Oligonucleótidos	29
Tabla 4. Tampones	30
Tabla 5. Plásmidos	33
Tabla 6. Cebadores utilizados para la construcción de mutantes de G35P	35
Tabla 7. Cebadores utilizados para la construcción de los mutantes de delección de la proteína G36P	36
Tabla 8. Complementación <i>in vivo</i> de los mutantes de G35P	78
Tabla 9. K_{app} de la proteína G35P silvestre a DNA de cadena sencilla (114 nt) y de los mutantes puntuales en tampón D presencia de 5 mM MgCl ₂ y 2,5 mM EDTA	81
Tabla 10. K_{app} de la proteína G35P silvestre a DNA de cadena doble (416 pb) y de los mutantes puntuales en tampón D presencia de 2,5 mM EDTA	82

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La replicación del DNA en procariotas

La replicación es un proceso crucial del ciclo celular de todos los organismos, que permite que la información genética se transmita de una célula madre a las células hijas. Este proceso se ha estudiado extensivamente en bacterias y en sus bacteriófagos.

En procariotas y en la mayoría de virus con DNA de doble cadena circular, la replicación empieza en un único origen de replicación, mientras que en los eucariotas y en las arqueas se encuentran normalmente múltiples orígenes en cada cromosoma lineal. El reconocimiento del origen, el reclutamiento de la maquinaria de replicación y la remodelación del complejo de replicación, son etapas comunes de la replicación de todos los organismos y son llevadas a cabo por múltiples proteínas.

1.1.1 El comienzo de la replicación en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*

B. subtilis y *E. coli* son organismos utilizados como modelos para estudiar la replicación del cromosoma en bacterias Gram positivas y en bacterias Gram negativas, respectivamente. La comparación entre las proteínas implicadas en la replicación del DNA cromosómico de *B. subtilis* y *E. coli* revela similitudes y diferencias.

En *E. coli* la replicación del cromosoma circular se inicia en la región *oriC*, donde 20-40 monómeros de la proteína organizadora del replisoma DnaA unen cuatro repeticiones de una secuencia consenso de 9 nt llamada caja DnaA (Fuller, *et al.*, 1984, Schaper & Messer, 1995), formando un complejo nucleoproteico que se denomina complejo inicial (Fuller, *et al.*, 1984, Bramhill & Kornberg, 1988). Sucesivamente, más monómeros de DnaA forman el complejo abierto catalizando el desanillamiento de una región constituida por tres repeticiones de una secuencia de 13 nt rica en AT. Probablemente este complejo abierto se mantiene gracias a la proteína SSB que cubre el DNA de cadena sencilla (**Figura 1**) (Bramhill & Kornberg, 1988, Marians, 2000). En *B. subtilis* las cajas DnaA de la región *oriC* están agrupadas en dos regiones no codificantes situadas a cada lado del gen *dnaA*. La replicación comienza cuando el organizador del replisoma DnaA,

que presenta alta homología con DnaA de *E. coli*, una múltiples repeticiones de 16 nt (cajas DnaA) y desanilla la región adyacente rica en AT (Bramhill & Kornberg, 1988, Fukuoka, *et al.*, 1990, Moriya, *et al.*, 1992). La replicación procede bidireccionalmente: en dirección de las agujas del reloj cuando se inicia en el lado derecho de *dnaA*, y en sentido contrario cuando se inicia en el *oriC* izquierdo (Lemon KP, 2002). Además de DnaA, intervienen en la formación del primosoma de *E. coli* las proteínas DnaB, DnaC y DnaG que son respectivamente una helicasa replicativa (LeBowitz & McMacken, 1986), su cargador (Wahle, *et al.*, 1989) y la primasa (Rowen & Kornberg, 1978). En *B. subtilis* se requieren la helicasa replicativa DnaC, que tiene homología con la helicasa DnaB de *E. coli*, la proteína DnaG, con actividad primasa, y las proteínas DnaB, DnaD, DnaI, cuya presencia de homólogos no es obvia en *E. coli* (Kunst, *et al.*, 1997).

La proteína DnaB de *E. coli* es un hexámero estable en forma de anillo que puede adoptar diferentes simetrías (C-3 y C6) (San Martin, *et al.*, 1995). La proteína DnaC es una ATPasa que ensambla un complejo 6:6 con la helicasa hexamérica DnaB y que a su vez está unida a ATP (Wahle, *et al.*, 1989, Learn, *et al.*, 1997). DnaA unido a *oriC* recluta dos complejos DnaB₆-DnaC₆-ATP, interaccionando directamente con DnaB (Marszalek & Kaguni, 1994). Esto da lugar a la formación de dos horquillas de replicación que migran en direcciones opuestas desde *oriC* (Fang, *et al.*, 1999). DnaB puede cargarse sola en el *oriC*, sin embargo, el cargado es más eficiente en presencia de DnaC, que facilita la apertura del anillo entre las subunidades de la helicasa y de tal forma que el DNA pueda pasar por el canal central. Cuando el ATP, unido a DnaC se hidroliza, DnaC se separa del complejo y la proteína DnaB queda activada (Davey & O'Donnell, 2003) (**Figura 1**). DnaB unida al complejo abierto cataliza el desanillamiento del DNA de doble cadena y recluta, mediante interacción física, la primasa DnaG (Lu, *et al.*, 1996) y la subunidad τ de la polimerasa PolIII (Kim, *et al.*, 1996). La actividad helicasa de DnaB es estimulada por la proteína de unión a cadena sencilla SSB (Arai & Kornberg, 1981, LeBowitz & McMacken, 1986) sin embargo, se ha demostrado que SSB inhibe la actividad ATPasa de DnaB (Arai & Kornberg, 1981).

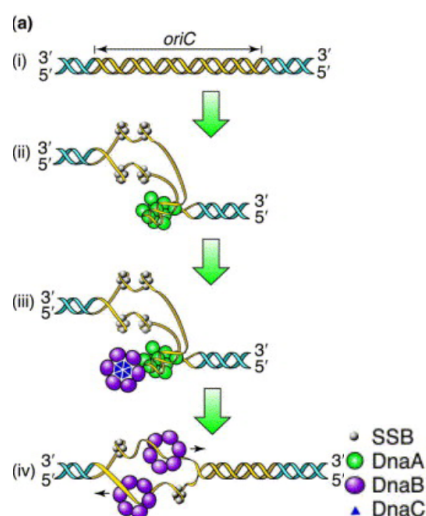


Figura 1. El comienzo de la replicación en *E. coli*. (i) el DNA de *E. coli* con *oriC* (ii) DnaA se une a sus cuatro sitios de unión en *oriC* y desnaturaliza la región rica en AT; El DNA de cadena sencilla presumiblemente se recubre de SSB; (iii) La interacción proteína-proteína entre DnaA y DnaB recluta el complejo DnaB-DnaC de modo que DnaB se une al DNA desnaturalizado en una región libre de SSB. (iv) Se cargan dos hexámeros de DnaB y se forman dos horquillas de replicación. Figura tomada del paper de Mariani y colaboradores 2000 (Mariani, 2000).

Mientras el cargado de la helicasa DnaB en *E. coli* es mediado por una única proteína (Mariani, 2000), la helicasa DnaC de *B. subtilis* requiere tres cargadores: DnaD DnaB y DnaI (Velten, *et al.*, 2003).

La proteína DnaC (la helicasa replicativa homóloga a *E. coli* DnaB) de *B. subtilis* también pertenece a la familia de helicasas hexaméricas con forma de anillo (Dervyn, *et al.*, 2001) y puede ensamblar autónomamente un hexámero (Velten, *et al.*, 2003). Sin embargo, tanto el monómero como el hexámero son inactivos según ensayos *in vitro*. Para que la proteína se cargue correctamente se requiere que el cargador DnaI (el cargador de helicasa homóloga a *E. coli* DnaC) ensamble alrededor del DNA un complejo dodecamérico formado por un hexámero de DnaC y seis monómeros de DnaI en presencia de ATP (Velten, *et al.*, 2003). Aún no se ha descrito con detalle la mecánica con la cual se inicia la replicación en *B. subtilis*, pero se sabe que la proteína DnaD (que no tiene correspondiente en *E. coli*) interacciona con DnaA en el origen *oriC* (Ishigo-Oka, *et al.*, 2001) formando el complejo *oriC*-DnaA-DnaD. Luego, el cargador DnaB, que lleva a cabo diferentes funciones, interacciona con DnaD (Bruand, *et al.*, 2005) y coopera con DnaI como “co-cargador” de DnaC (Velten, *et al.*, 2003, Nunez-Ramirez, *et al.*, 2007), estimulando la actividad helicasa de DnaC. Cuando la helicasa se carga sobre el DNA cataliza el desanillamiento de la doble cadena, favoreciendo la formación del complejo abierto. Este complejo se mantiene abierto gracias a la proteína SsbA que estabiliza el DNA de cadena sencilla.

En *E. coli* la helicasa DnaB recluta sobre el DNA a la proteína primasa DnaG que actúa sintetizando el cebador de la cadena líder y los fragmentos de Okazaki de la cadena retrasada. DnaG cataliza la síntesis de oligoribonucleótidos de 11 residuos aproximadamente (Zechner, *et al.*, 1992, Xu & Marians, 2000) de forma dependiente de la presencia de la helicasa o de proteínas de unión a DNA de cadena sencilla. La interacción entre DnaB y DnaG en *E. coli* permite que la helicasa, en su movimiento por el DNA en dirección 5'-3', transporte a la primasa. Las primasas de *E. coli* y *Bacillus stearothermophilus* interaccionan físicamente y funcionalmente con la proteína DnaB, mediante el dominio C-terminal (Soultanas, 2005). Es importante evidenciar que en *B. stearothermophilus* y en *E. coli*, la proteína helicasa homóloga a DnaC de *B. subtilis*, se denomina DnaB. La proteína DnaG de *B. stearothermophilus*, cataliza la síntesis de 22-23 residuos, sin embargo existen mutantes de DnaB que reducen el tamaño de los oligonucleótidos sintetizados (Thirlway & Soultanas, 2006) y mutantes que inhiben totalmente la actividad primasa. Mediante varios ensayos se ha demostrado que DnaB es capaz de modular la actividad de DnaG (Zechner, *et al.*, 1992, Thirlway & Soultanas, 2006).

La proteína DnaB de *E. coli* recluta además en el complejo abierto a la polimerasa, que empezará la síntesis del nuevo DNA (Dallmann, *et al.*, 2000).

1.1.2 La elongación de la replicación

En *E. coli*, el holoenzima DNA polimerasa III está formado por diez proteínas que se pueden dividir en tres partes funcionales: i) el núcleo de la polimerasa, que está compuesto por las subunidades α , ϵ (que proporcionan, respectivamente, la actividad polimerasa y la actividad exonucleasa 3'-5') y por la subunidad θ , con función desconocida (McHenry & Crow, 1979), ii) el factor de procesividad β_2 (Kong, *et al.*, 1992), iii) el complejo DnaX que es el cargador del factor de procesividad que está formado por $\tau_2\gamma_2\delta\delta'\chi\psi$ (Dallmann & McHenry, 1995). En cambio, *B. subtilis*, como los eucariotas, codifica por dos diferentes polimerasas esenciales para la elongación de la replicación: PolC y DnaE (Bruck, *et al.*, 2005). El dominio C-terminal de PolC posee actividad polimerasa (como la subunidad α de *E. coli*), mientras que el dominio N-terminal tiene actividad exonucleasa y equivaldría a la subunidad ϵ de *E. coli* (Sanjanwala & Ganesan, 1989, Sanjanwala & Ganesan, 1991, Barnes, *et al.*, 1994). La segunda polimerasa, DnaE, carece de la actividad exonucleasa y es homóloga a la subunidad α de

bacterias Gram negativas (Flett, *et al.*, 1999). PolC es la responsable de la síntesis de la cadena líder del cromosoma, es rápida y fiel, mientras que para la síntesis de la cadena retrasada se requieren ambas polimerasas: PolC y DnaE. DnaE, en la síntesis de la cadena retrasada, sólo genera el molde y sucesivamente la polimerasa PolC lleva a cabo la replicación de la cadena (Sanders, *et al.*, 2010).

En *B. subtilis* el complejo DnaX está formado por la subunidades $\tau\delta\delta'$, y el factor de procesividad está formado por la subunidad β . La presencia de la subunidades θ , γ , χ y ψ no es evidente en bacterias Gram-positivas (Bruck & O'Donnell, 2000, Noirot-Gros, *et al.*, 2002). El gen *dnaX* de *B. subtilis* codifica por una proteína de 63 kDa, la subunidad τ , que tiene gran homología en toda la secuencia con otras proteínas equivalentes en Gram positivas y sólo en el amino-terminal con proteínas Gram negativas. Se demostró que la subunidad τ de bacterias Gram positivas, como *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*, interacciona débilmente con el fuerte complejo $\delta\delta'$ para formar el cargador del factor de procesividad $\tau\delta\delta'$ (Bruck & O'Donnell, 2000, Bruck, *et al.*, 2005). Este último complejo utiliza la energía de hidrólisis del ATP para abrir el anillo β y cargar el factor de procesividad sobre el DNA. Se sabe además que la helicasa DnaB y la primasa DnaG de *Geobacillus stearothermophilus* forman con la subunidad τ de *B. subtilis* un núcleo estructural, donde la helicasa actúa como conector entre la primasa y τ (Chintakayala, *et al.*, 2009).

1.1.3 La proteína SSB

La proteína SSB es una proteína esencial que interviene en los procesos de replicación, de recombinación y de reparación del DNA. SSB une con alta afinidad al DNA de cadena sencilla para protegerlo de la digestión por parte de nucleasas y para prevenir la formación de estructuras secundarias de manera que otras proteínas puedan cargarse sobre el DNA.

En *E. coli* la proteína SSB presenta un dominio N-terminal (residuos 1-115) llamado OB, del inglés *oligonucleotide/oligosaccharide-binding* que permite a la proteína unirse al DNAs a través de una combinación de interacciones electrostáticas con el esqueleto fosfodiéster y de apilamiento con las bases de los nucleótidos (Casas-Finet, *et al.*, 1987, Overman & Lohman, 1994). La proteína SSB puede unirse al DNA de forma altamente cooperativa, formando filamentos a lo largo del DNA; es un homotetrámero que tiene

múltiples modos de unión, según sean las concentraciones de NaCl y Mg^{2+} , que difieren en el número de monómeros que interaccionan con el DNA de cadena simple (Meyer & Laine, 1990, Lohman & Ferrari, 1994). El modo de unión (SSB)₆₅ se da cuando 65 nucleótidos de un DNA de cadena sencilla son cubiertos e interaccionan con los cuatro monómeros que forman el homotetrámero, mientras que en la modalidad de unión (SSB)₃₅, 35 nucleótidos interaccionan sólo con dos monómeros de SSB (Shereda, *et al.*, 2008). Las estabildades relativas de los diferentes modos de unión entre SSB y el DNA dependen de la concentración de sal, de magnesio y de la presencia de poliaminas, espermina y espermidina (Lohman & Overman, 1985, Bujalowski & Lohman, 1986, Vellani & Myers, 2003). La modalidad (SSB)₆₅ es favorecida a concentraciones de sal por encima de 200 mM, mientras la modalidad (SSB)₃₅ es favorecida a alta proporción de SSB frente ssDNA (Griffith, *et al.*, 1984, Lohman, *et al.*, 1986).

Se ha demostrado que la proteína SSB de *E. coli* une a través del dominio C-terminal por lo menos 14 proteínas implicadas en replicación, recombinación y reparación del DNA (Shereda, *et al.*, 2008). En *B. subtilis* la proteína SsbA interacciona a través del dominio C-terminal con 12 proteínas (Costes, *et al.*, 2010), lo que sugiere que existe un mecanismo conservado por el que las proteínas de replicación, recombinación y reparación pueden reconocer y unirse a SSB. La secuencia Asp-Phe-Asp-Asp-Asp-Ile-Pro-Phe que constituye el dominio C-terminal de SSB de *E. coli* está altamente conservada en bacterias (Lu & Keck, 2008). Debido a su alta densidad de residuos de aspartato, esta región se denomina “cola ácida”. Estudios con mutantes de SSB han revelado que en ausencia del dominio C-terminal, las proteínas mutantes pueden formar homotetrámeros, sin embargo el equilibrio se desplaza hacia la formación de complejos (SSB)₃₅, lo que sugiere que las interacciones de las proteínas con el C-terminal podrían regular la transición del modo de unión (Roy, *et al.*, 2007). En *E. coli* la ausencia de los últimos 10 aminoácidos de SSB en *E. coli* da lugar a células inviables (Curth, *et al.*, 1996), mientras que en *B. subtilis* la ausencia de los últimos 35 aminoácidos del dominio C-terminal de la proteína SsbA da lugar a células sensibles a la temperatura y al daño provocado por la luz ultravioleta (Costes, *et al.*, 2010).

Hasta ahora se ha demostrado que la proteína SSB de *E. coli* interacciona con la DNA polimerasa PolIII a través de la subunidad χ y que la interacción se da mediante el dominio C-terminal de SSB (Kelman, *et al.*, 1998). La interacción χ -SSB juega un papel fundamental en el desplazamiento de la primasa del cebador de RNA (Yuzhakov, *et al.*, 1999). Cuando la primasa sintetiza el cebador, se une fuertemente a éste para protegerlo de la acción de otras proteínas. Sin embargo, es necesario que la primasa se desplace para

permitir el cargado del factor de procesividad β . La subunidad χ se encarga de desplazar a la primasa. En este proceso interviene la proteína SSB que, interaccionando con las proteínas primasa y χ , promueve el desplazamiento de la primasa a favor del cargado de β (Yuzhakov, *et al.*, 1999). Aún no se ha identificado el dominio con el cual SSB interacciona con la primasa, pero se apuesta que primasa y χ compitan para unirse en el extremo C-terminal (Shereda, *et al.*, 2008). La proteína SSB interviene además en el proceso de reensamblado de la horquilla de replicación. Se ha demostrado que la proteína PriA puede interaccionar y desplazar SSB de un DNA de cadena sencilla (Arai, *et al.*, 1981, Allen & Kornberg, 1993) y que SSB estimula la actividad helicasa de PriA (Jones & Nakai, 1999, Cadman & McGlynn, 2004). Analizando un mutante de delección de SSB en el que se han truncado los último 10 aa del dominio C-terminal se corroboró que éste no era capaz de estimular la actividad helicasa de PriA, por lo tanto también en este caso la interacción parece producirse a través del dominio C-terminal (Cadman & McGlynn, 2004).

En *B. subtilis* la proteína SsbA, es una proteína de 172 residuos que une con alta afinidad DNA de cadena sencilla (Manfredi, *et al.*, 2008). Su dominio C-terminal también está enriquecido en aminoácidos ácidos y es el responsable de la interacción con 12 proteínas implicadas en replicación, recombinación y reparación del DNA (Costes, *et al.*, 2010). En particular, se ha demostrado que la proteína SsbA interacciona a través del dominio C-terminal con la helicasa PriA (Costes, *et al.*, 2010). Además, recientemente se ha publicado que SsbA interacciona con la proteína DnaE (Rannou, *et al.*, 2013).

1.1.4 Re-ensamblado de la horquilla de replicación

Una vez que el replisoma está ensamblado en el origen de replicación, comienza la síntesis del DNA. Sin embargo, durante su movimiento a lo largo del cromosoma, la horquilla de replicación a menudo encuentra daños en la cadena molde, que en algunos casos pueden ser eludidos por la maquinaria de replicación que continúa su síntesis dejando atrás un hueco de DNA de cadena sencilla que será reparado por proteínas de reparación de DNA y de recombinación (Langston & O'Donnell, 2006).

Para prevenir el bloqueo de la replicación, algunas polimerasas con baja fidelidad son capaces de incorporar un nucleótido aunque el molde se encuentre dañado, y después, reanudan la síntesis con alta fidelidad (Tippin, *et al.*, 2004, Friedberg, *et al.*, 2005). En

otros casos, la horquilla de replicación no puede evitar el daño, o bien puede encontrar durante su movimiento proteínas que bloquean su paso y que llevan a cabo el desensamblado de la horquilla de replicación (Haber, 1999). Para que este efecto no sea letal es necesario que el daño sea reparado, o bien que se elimine el obstáculo, para que la horquilla de replicación pueda re-ensamblarse (Kuzminov, 1995, Liu & Marians, 1999, Cox, *et al.*, 2000). En procariotas el mecanismo de re-ensamblado es llamado “Replicación Dependiente de Recombinación (RDR)” mientras que en eucariotas se denomina “Replicación Inducida por Corte”.

El re-ensamblado de la horquilla requiere proteínas específicas que actúan en distintos pasos y que se intervienen según el tipo de daño que ha determinado la parada de la replicación (Marians, 2004, Michel, *et al.*, 2004). Una proteína clave de este proceso es PriA, una helicasa que une con alta afinidad y especificidad bucles-D, estructuras formadas por un DNA superenrollado invadido por un fragmento de DNA homólogo (Nurse, *et al.*, 1999), y que promueve el reclutamiento de DnaB sobre el DNA de cadena sencilla sin la necesidad de la presencia del organizador del replisoma DnaA (Liu & Marians, 1999). Este paso determina el re-ensamblado de la horquilla de replicación (Figura 2).

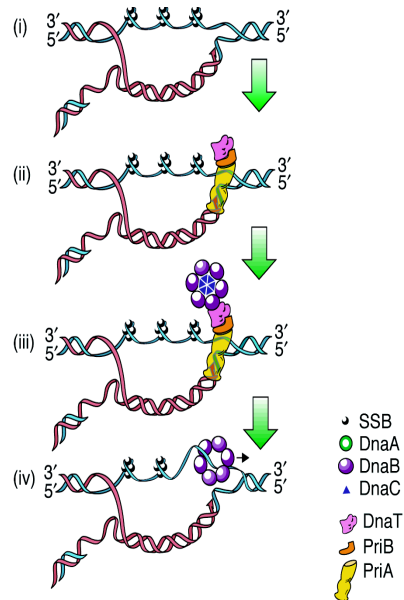


Figura 2. Esquema del cargado de la helicasa DnaB dependiente del control de PriA en *E. coli*. PriA reconoce el bucle-D y se une al extremo 3' de la cadena invasora. Cargado del complejo PriA-PriB-DnaT en el bucle-D (i) y (ii). Se recluta el complejo DnaB-DnaC, probablemente mediante la interacción con DnaT. A continuación es posible que la proteína DnaC una, en la cadena desplazada, DNA de cadena sencilla libre de SSB (iii). Este evento conduce al cargado de la helicasa DnaB en la hebra desplazada del bucle-D. Cuando el primosoma se carga en la cadena desplazada de un bucle-D el extremo 3'-OH de la cadena invasora es utilizado como cebador para la síntesis de la cadena líder. En azul se muestra la cadena parental y en rojo la cadena de nueva síntesis. Figura tomada del paper de Marians 2000 (Marians, 2000).

En *E. coli* se identificaron como proteínas necesarias para la replicación PriA, PriB, PriC, DnaB, DnaC, DnaG y DnaT, sin embargo, sólo DnaB, DnaC y DnaG eran esenciales para

iniciar la replicación desde *oriC* (Heller & Marians, 2006). En cambio, *B. subtilis* requiere únicamente PriA, DnaB (que no tiene que ser confundida con la helicasa replicativa de *E. coli*) DnaD y DnaI. En esta bacteria la presencia de PriB, PriC y DnaT no es obvia (Lecointe, *et al.*, 2007).

1.2 El bacteriófago SPP1

SPP1 es un fago lítico que se aisló por primera vez en Pavia (Subtilis Phage Pavia) y que infecta *B. subtilis* (Riva, *et al.*, 1968). Se sabe que la infección se da por absorción y que aproximadamente el 90% del DNA de SPP1 se transfiere en el interior de la célula tras 10 minutos de incubación (Zsigray, *et al.*, 1973). Se ha publicado recientemente, que durante la infección, la interacción entre SPP1 y su receptor de membrana YueB provoca en *B. subtilis* una rápida despolarización de la membrana que depende de la concentración de YueB en la superficie celular y de la concentración de calcio presente en el medio. Esta despolarización facilita la entrada del DNA dentro de la célula (Jakutyte, *et al.*, 2012).

El DNA de SPP1 tiene una longitud de 44,007 pb, mientras que el DNA empaquetado es de 45.5 kb y presenta una redundancia en la parte terminal del 4% (Morelli, *et al.*, 1979, Tavares, *et al.*, 1996). Después de la inyección del DNA lineal, el cromosoma de SPP1 se recirculariza gracias a la homología entre los extremos por un proceso poco conocido, que requiere la proteína ligasa del hospedador. A continuación empieza la transcripción de sus genes. Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* demuestran que existen cinco promotores tempranos (PE₁-PE₅) y cinco promotores tardíos (PL₁-PL₅) (Montenegro & Trautner, 1981, Stuber, *et al.*, 1981, Tailor, *et al.*, 1985, Chai, *et al.*, 1992, Chai, *et al.*, 1993, Pedre, *et al.*, 1994) (**Figura 3**). Los productos de los operones PE₁ (que regula la expresión de los genes aguas abajo del gen 45.1) y PE₄ (que regula la expresión de los genes aguas abajo del gen 33) no son esenciales. Mientras que PE₂ y PE₃ (que regulan la expresión de los genes aguas abajo del gen 37.3 y del gen 34) contienen genes esenciales (Tailor, *et al.*, 1985, Chai, *et al.*, 1992, Chai, *et al.*, 1993, Pedre, *et al.*, 1994). El promotor PE₅ aún no ha sido caracterizado. El operón regulado por PE₂ contiene genes implicados en el comienzo de la replicación, y el operón regulado por PE₃ los genes implicados en recombinación. Los operones tardíos codifican por proteínas estructurales del virión (Esche, 1975).

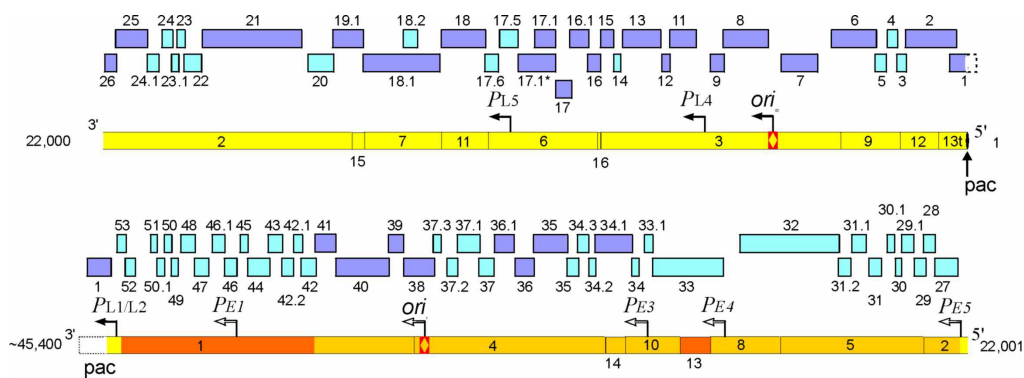


Figura 3. El cromosoma de SPP1. Las dos barras principales denotan la secuencia madura del fago (1 a ~45,9 kb). Con los números dentro de la barra se indican los 16 fragmentos de DNA que se obtienen cortando el DNA con la enzima EcoRI. En naranja se indican las regiones con genes prescindibles, en amarillo oscuro los genes tempranos, en amarillo claro los genes tardíos. El fragmento EcoRI-13t tiene un extremo generado por digestión con EcoRI y el otro generado mediante corte en el sitio *pac* por la enzima terminasa. La región *pac* se encuentra dentro de fragmento de DNA EcoRI-1. Para presentar el total del fragmento EcoRI-1, las primeras 718 pb (indicadas con el fragmento 13t) se muestran de nuevo en la barra inferior (fragmento sin color). Por lo tanto, el gen 1 también se presenta dos veces. Las casillas moradas indican los productos génicos que han sido genéticamente o bioquímicamente caracterizados, mientras las azules representan los genes con función desconocida. Figura tomada del paper de Alonso y colaboradores 1997 (Alonso, *et al.*, 1997). El gen 44 se caracterizó en este trabajo.

La procápside de SPP1 es esférica y está compuesta por la proteína portal G6P, la proteína menor de la cápside G7P, la proteína estructural G11P, y la proteína mayor de la cápside G13P (Becker, *et al.*, 1997, Droge & Tavares, 2000). Una vez formada la procápside el DNA tiene que ser empaquetado en ella. El empaquetamiento requiere el montaje de una compleja maquinaria en un sitio específico de la procápside. La maquinaria de empaquetamiento se compone de la proteína portal G6P, que proporciona un túnel para la entrada del DNA, de la subunidad grande de la terminasa con actividad ATPasa, G2P, que genera la energía para la translocación del DNA (Camacho, *et al.*, 2003) y de la subunidad pequeña de la terminasa, G1P, que media la interacción con el DNA que se tiene que empaquetar (Chai, *et al.*, 1992). En particular G1P reconoce los sitios de empaquetamiento *pacL* (extremo de DNA que no se encapsida, o izquierdo) y *pacR* (extremo de DNA que se encapsida, o derecho) en una molécula lineal de DNA (Camacho, *et al.*, 2003) y forma una estructura nucleoproteica que sitúa a G2P. A su vez, la proteína G2P interacciona físicamente con la proteína portal G6P (Oliveira, *et al.*,

2010). Finalmente la proteína G2P cataliza dos cortes en cada una de las regiones llamadas cajas-b que se sitúan dentro de la secuencia *pacC* que se encuentra entre las secuencias *pacL* y *pacR*.

Sólo el DNA de doble cadena concatémico, formado por múltiples copias de genoma en una misma molécula, puede ser empaquetado (Gual, *et al.*, 2000). Este tipo de DNA se produce mediante un mecanismo de replicación llamado replicación tipo σ . El DNA se empaqueta hasta llenar la procápside (por lo que es llamado empaquetamiento por cabeza llena), lo que supone que, a partir del sitio *pac*, se empaqueta un 104% del genoma del fago. Entonces G2P corta el DNA en una región distinta a *pac* y la procápside pasa a su estado maduro de estructura icosaédrica. (Becker, *et al.*, 1997, Lurz, *et al.*, 2001). El poro se cierra gracias a las proteínas G15P y G16P que completan la cabeza para evitar que el DNA empaquetado se libere (Becker, *et al.*, 1997, Lurz, *et al.*, 2001, Orlova, *et al.*, 2003). Finalmente la cola formada por la proteína G17.1P completa el ensamblaje de la estructura del virión. La segunda procápside que se llena comienza a empaquetar el DNA en el sitio donde se terminó de empaquetar la primera molécula del genoma, dando lugar a una población cuyos genomas son redundantes (104%) y permutados (cada uno tiene una secuencia diferente duplicada).

SPP1 provoca la lisis de su hospedador circa 30 minutos después de la infección a 37°C. Aún no se ha descrito el mecanismo de lisis pero parece que en este proceso estarían implicadas las proteínas G25P y G26P que presentan un 37% y un 46% de homología de secuencia, respectivamente, con la proteína N-acetilmuramil-1-alanina amidasa y con la proteína holina de *B. subtilis* o *Bacillus licheniformis* (Bendtsen, *et al.*, 2002).

1.2.1 El comienzo de la replicación en SPP1: la replicación tipo θ

Tras la infección, el DNA lineal de SPP1 circulariza mediante su extremos redundantes. Como otros virus con DNA circular, el comienzo de la replicación depende de un origen (*ori*), y la replicación es de tipo θ . Sin embargo, tras una o más rondas de replicación, ocurre un cambio de replicación a tipo σ (replicación dependiente de recombinación, RDR). Este cambio es necesario para generar concatémeros, que son indispensables para el correcto empaquetamiento del DNA en la procápside viral, y para que el DNA se duplique con un alto rendimiento (Taylor & Wegrzyn, 1995, Ayora, *et al.*, 2002). El cambio de replicación de tipo θ a tipo σ ocurre también en otros fagos, como por ejemplo λ , en virus de la familia herpes virus del tipo I, y en la replicación de mitocondrias y

cloroplastos (Skalka, 1977, Ling & Shibata, 2004, Oldenburg & Bendich, 2004, Strang & Stow, 2005, Shutt & Gray, 2006, Pohjoismaki, *et al.*, 2009, Szczepanska, 2009).

La replicación tipo θ de SPP1 es unidireccional y comienza probablemente en un origen de replicación. Estudios de microscopía electrónica han mapeado que el inicio de la replicación se da en una región que se encuentra a la distancia aproximada de 0,16 Kb respecto al extremo terminal izquierdo del genoma de SPP1 (Ganesan, 1976). En esta región se encuentra la secuencia *oriL* (Missich, *et al.*, 1997). Sin embargo, utilizando timidina radioactiva en experimentos de pulso y caza, se mapeó como sitio de inicio de la replicación una región que se encuentra a una distancia aproximada de 0,2 Kb respecto al extremo terminal derecho (McIntosh, *et al.*, 1978), donde se sitúa *oriR* (Alonso, *et al.*, 1997).

El comienzo de la replicación requiere tres genes esenciales que se descubrieron mediante el análisis de mutantes de SPP1. Los genes 38, 39 y 40, que se transcriben a partir del promotor E₂, codifican respectivamente para la proteína de iniciación de la replicación, el cargador de la helicasa, y la helicasa replicativa (Alonso JC, 2006, Heller & Mariani, 2006). Experimentos genéticos realizados con mutantes termosensibles demostraron que además de las proteínas G38P, G39P, y G40P, la replicación tipo θ de SPP1 requiere la proteína primasa (DnaG), la holoenzima DNA polimerasa y las topoisomerasas, codificadas por el huésped (Pedre, *et al.*, 1994). Experimentos *in vitro* demostraron que G38P se une a las dos regiones *oriL* y *oriR*. *oriL* se encuentra dentro del gen 38, y muestra un alto grado de identidad con *oriR*, situado en una región no codificadora a 12 Kb de distancia (Pedre, *et al.*, 1994). Ambas regiones presentan cinco repeticiones de dos tipos de 10 pb (cajas A y B) situadas antes de una región rica en AT de 30 pb, pero la proteína G38P se une a *oriR* con una afinidad 3-4 veces menor que a *oriL* (Missich, *et al.*, 1997). Ensayos *in vitro* han revelado que múltiples copias del monómero de G38P se unen a *oriL* or *oriR*, lo que presumiblemente da lugar a la formación del complejo abierto (Pedre, *et al.*, 1994, Missich, *et al.*, 1997, Ayora, *et al.*, 1999). Para estabilizar el DNA de cadena sencilla es probable que sea necesaria la presencia de G36P, que es la proteína de unión a cadena sencilla codificada por SPP1. En presencia de ATP, la helicasa hexamérica G40P interacciona con su cargador G39P (Barcena, *et al.*, 1998, Ayora, *et al.*, 1999) y según el modelo actual el complejo G39P-G40P-ATP interacciona a través de G39P con G38P, unido a *oriL*. De esta forma la helicasa se carga en el origen, mientras el complejo G38P-G39P abandona el complejo de replicación (Ayora, *et al.*, 1998). Una vez que la helicasa queda sola en el complejo es completamente activa. G40P cataliza el desanillamiento del DNA y carga en la horquilla de replicación de SPP1 la proteína

primasa, o DnaG, de *B. subtilis* por interacción directa proteína-proteína (Ayora, *et al.*, 1998, Barcena, *et al.*, 1998, Lecoite, *et al.*, 2007) y la holoenzima DNA polimerasa III por su interacción con la proteína τ (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2002). Una vez que la polimerasa se sitúa en el primosoma, la replicación comienza dando como producto moléculas circulares del genoma.

La helicasa G40P tiene una homología de secuencia del 46% con DnaB de *B. stearothermophilus* y del 36% con DnaB de *E. coli*. G40P posee múltiples actividades enzimáticas: G40P une e hidroliza NTP en presencia de magnesio, une DNA de cadena sencilla, y desaparea el DNA de cadena doble con una polaridad estricta 5'-3' (Ayora, *et al.*, 2002). En solución es un hexámero que se desensambla para permitir que el DNA entre en su cavidad central. La estructura por difracción de rayos X del monómero de G40P revela que la proteína posee un dominio N-terminal globular, compuesto por cuatro α -hélices (h1-h4), como la proteína DnaB de *E. coli* (Fass, *et al.*, 1999, Weigelt, *et al.*, 1999), una región conectora, compuesta por dos α -hélices (h5-h6) antiparalelas que forman una horquilla tipo α ; y un dominio C-terminal similar a RecA, con actividad ATPasa, compuesto por nueve barriles beta tipo sándwich con tres α -hélices en cada lado. El monómero de G40P puede tener dos conformaciones diferentes, llamadas *cis*, cuando la horquilla tipo α se posiciona hacia el dominio C-terminal de la proteína, y *trans*, cuando se posiciona hacia el lado opuesto. Ambas conformaciones, *cis* y *trans*, participan en la formación del hexámero que puede tener dos simetrías diferentes (Wang, *et al.*, 2008). Estudios de mutantes de G40P demuestran que deleciones en el dominio N-terminal reducen la actividad helicasa de la proteína, y que la adicional deleción de algunos aminoácidos de la región conectora provoca la pérdida completa de la actividad (Wang, *et al.*, 2008). Además el dominio N-terminal juega un papel fundamental en la uni-direccionalidad 5'-3' de la actividad helicasa (Mesa, *et al.*, 2006).

La helicasa G40P es una de las helicasas replicativas para las que se conoce una mayor variedad de moduladores: es activada por la primasa DnaG, con la cual interacciona mediante el dominio N-terminal (Wang, *et al.*, 2008), por la polimerasa de *Bacillus subtilis* (Ayora, *et al.*, 1998, Martinez-Jimenez, *et al.*, 2002) y también ha sido descrita su interacción con otras dos proteínas del fago (G35P y G36P) (Ayora, *et al.*, 1998). En particular, se ha demostrado que G40P interacciona con la polimerasa a través de la subunidad de τ . La interacción entre el hexámero de G40P y el tetrámero de τ se da en la región C-terminal de ambas proteínas, con una estequiometría 1:1 (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2002). Es probable que a su vez la subunidad τ interaccione con las polimerasa DnaE y PolC (**Figura 4**), puesto que en *S. pyogenes* esta proteína participa en la formación de

ambos complejos $\text{PolC}_2\beta\tau_4\delta\delta'$ y $\text{DnaE}_2\beta\tau_4\delta\delta'$ (Bruck & O'Donnell, 2000).

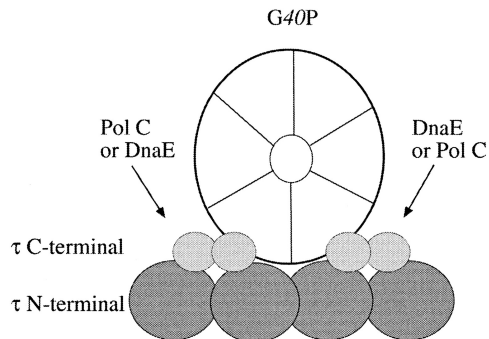


Figura 4. Modelo de la interacción de τ con el replisoma. El C-terminal de τ interacciona con la helicasa. Figura tomada del paper de Martínez-Jiménez y colaboradores 2002 (Martínez-Jiménez, *et al.*, 2002)

1.2.2 La replicación concatémica en SPP1

La horquilla de replicación durante la elongación del DNA puede sufrir una parada por la presencia de proteínas que impiden el avance de la horquilla o debido a la presencia de daños en la secuencia. En la replicación de SPP1, se sabe que en etapas tempranas se forman múltiples copias de DNA circular y que a continuación ocurre un cambio de replicación que genera varias copias de DNA concatémico que será empaquetado en las procápsides virales (Alonso JC, 2006). El cambio de replicación es independiente de las proteínas de recombinación (RecA, RecF, RecO, RecG, RecU, RuvAB y AddAB) (Ayora, no publicado) y de las proteínas de replicación (PriA, DnaB y DnaD) del huésped (Ayora, *et al.*, 2002, Lecointe, *et al.*, 2007) pero, requiere la proteína G35P (Burger & Trautner, 1978, Weise, *et al.*, 1994). Estudios de sedimentación han revelado que células de *B. subtilis* infectadas a temperaturas no permisiva, con mutantes termosensibles del fago SPP1 en G35P (*tsI20F* y *tsI17*) sintetizan un porcentaje menor de DNA concatémico frente a las células infectadas con el fago SPP1 silvestre. Además, las células infectadas con éstos mutantes acumulan copias de DNA con una longitud de 30-35 Kb (Burger & Trautner, 1978), lo que sugiere un fenotipo de parada de replicación.

La proteína G35P, es una proteína de 32 kDa, que cataliza el anillamiento de cadena sencilla entre un DNA de cadena sencilla circular y una cola homóloga 3' de un DNA de cadena doble, independiente de ATP (Ayora, *et al.*, 2002). Aún no se conoce la estructura de la proteína pero se cree que, por homología de secuencia con otras recombinasas que pertenecen a la superfamilia RecT, en su dominio C-terminal se sitúan aminoácidos que podrían estar implicados en la coordinación con el magnesio, necesario como cofactor

para la actividad (Iyer, *et al.*, 2002). G35P pertenece a la superfamilia de recombinasas RecT, cuyos miembros más estudiados son la proteínas RecT, codificada por el profago defectivo Rac de *E. coli*, y Red β , codificada por el fago λ . Estudios de microscopía electrónica revelan que las recombinasas de la familia RecT pueden formar anillos y filamentos en presencia y en ausencia de DNA de cadena sencilla (Thresher, *et al.*, 1995, Passy, *et al.*, 1999, Ayora, *et al.*, 2002). Recientemente se ha observado por microscopía de fuerza atómica que la proteína Red β sola no forma anillos, forma hélices que en presencia de DNA de cadena sencilla desaparecen. Red β forma filamentos estables sólo cuando cataliza el anillamiento de dos cadenas de DNA de cadena sencilla complementarias entre sí (Erler, *et al.*, 2009). En cambio, G35P forma con el DNA de cadena sencilla filamentos estables (Ayora, *et al.*, 2002). Normalmente, los genes que codifican por estas recombinasas se encuentran en el mismo operón que transcribe por una exonucleasa 5'-3', con las cuales estas proteínas suelen interaccionar (Muyrers, *et al.*, 2000, Datta, *et al.*, 2008). Los genes que codifican por las proteína G34.IP y G35P de SPP1 se transcriben bajo el mismo operón PE₃ (**Figura 3**). No se ha demostrado una directa interacción entre la exonucleasa 5'-3' G34.IP de SPP1 y G35P, pero se ha observado que la recombinasa puede estimular la actividad exonucleasa en presencia de DNA de doble cadena (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2005). Sin embargo, se sabe que la proteína G35P interacciona con la helicasa G40P y con la proteína de unión a cadena sencilla G36P, pero todavía no se conoce el significado biológico de la interacción (Ayora, *et al.*, 2002). Actualmente no se han descrito más interacciones entre recombinasas de la superfamilia RecT y otras proteínas implicadas en replicación o recombinación.

La proteína G34.IP se cree que es específica en la replicación tipo σ . Es una proteína de 36 kDa que no presenta homología relevante con nucleasas de otros sistemas de recombinación, como por ejemplo RecE (que empareja con RecT) o Red α (que empareja con Red β). G34.IP es capaz de digerir tanto DNA de cadena sencilla, como DNA de cadena doble, sin embargo la eficiencia en el segundo sustrato es mayor. Como RecE y Red α , requiere magnesio para su actividad, y su eficiencia es máxima a pH alcalino (Vellani & Myers, 2003, Martinez-Jimenez, *et al.*, 2005). Por su actividad exonucleasa la proteína G34.IP facilita la acción recombinasa de la proteína G35P, al generar en un sustrato de DNA de cadena doble una cola de cadena sencilla en el extremo 3', en la cual la recombinasa pueda unirse y catalizar el anillamiento en una secuencia de DNA homóloga (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2005).

Bajo el control del operón PE₃, aguas abajo del gen 35 se encuentra el gen 36. G36P es

una proteína de 18 kDa que tiene un alto grado de homología con otras proteínas fágicas y bacterianas por lo que se le atribuye la función de proteína de unión a cadena sencilla (SSB) (Alonso, *et al.*, 1997). Las SSB suelen tener gran afinidad por DNA de cadena sencilla de forma que son protectoras de estas zonas frente al ataque de exonucleasas y endonucleasas. En general, no son específicas de secuencia (Chase & Williams, 1986) y su estado oligomérico en solución es variable. La SSB de *E. coli* es un homotetrámero (Chase & Williams, 1986), g32p del fago T4 y P5 de Φ 29 son monómeros (Gutierrez, *et al.*, 1991, Shamoo, *et al.*, 1995), mientras que en organismos termófilos son homodímeros (Dabrowski, *et al.*, 2002, Eggington, *et al.*, 2004). Se ha descrito que G36P interacciona con G35P (Ayora, *et al.*, 2002) y que estimula la actividad de intercambio de cadena de la recombinasa (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2005). En otro virus que codifican por recombinasas de la familia RecT (Rac y Red β) no se han identificado proteínas de unión a DNA de cadena sencilla tipo SSB.

En base a datos bioquímicos obtenidos *in vitro*, se propuso un modelo del cambio de replicación de tipo θ a tipo σ . Según el modelo, la replicación del genoma de SPP1 empezaría por tipo θ y tras una o más rondas de replicación sería bloqueada por la proteína G38P, que unida a *oriR* podría actuar como barrera para la maquinaria de replicación. Eso daría lugar a una rotura de la doble cadena, una regresión de la horquilla de replicación, y a la consecuente formación de una estructura de cuatro ramas o intermedio de Holliday (Seigneur, *et al.*, 1998). La resolución de este intermedio podría ser llevada a cabo por una proteína de SPP1 actualmente desconocida que generaría un extremo de doble cadena. Este sustrato es procesado por G34.1P, la proteína exonucleasa 5'-3', que genera un DNA de cadena sencilla en el cual la proteína G35P puede cargarse (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2005). La proteína G35P promueve la invasión del DNA de cadena sencilla en un DNA homólogo de doble cadena (Ayora, *et al.*, 2002) (**Figura 5 a y b**).

En otra molécula de DNA, la proteína G38P se encontraría unida al origen y con la ayuda de la proteína G36P podría estar formando un complejo abierto en el cual la proteína G35P podría catalizar la invasión de la doble cadena. Se sabe que la proteína G35P interacciona con las proteínas G36P, la cual podría favorecer su cargado, y con la helicasa G40P. La helicasa podría cargarse o bien interaccionando con G35P, o mediante su cargador G39P. El cargado de G40P permite el ensamblaje de la maquinaria de replicación constituida por la primasa DnaG y las polimerasas PolC y DnaE.

La invasión de DNA de cadena sencilla catalizada por la proteína G35P en un DNA de cadena doble homólogo forma un intermedio de recombinación llamado bucle-D. Se cree

que la síntesis concatémica pueda iniciarse a partir de este sustrato. Se propusieron dos modelos para explicar cómo empezaría la replicación concatémica en SPP1. En el primer modelo (en la **Figura 5 c1**), tras la invasión del DNA de doble cadena catalizada por G35P, se reconstituye el replisoma y el extremo 3'-OH del DNAs invasor es utilizado como cebador para la síntesis de DNA. Una vez restablecida la replicación, una endonucleasa desconocida podría cortar específicamente la estructura bucle-D (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2005) (**Figura 5 c2**). La síntesis de DNA concatémico podría reanudarse a partir del extremo 3'-OH generado de forma similar a lo que ocurre en la replicación de círculo rodante de plásmidos (**Figura 5 c3 y c4**) En tal hipótesis el mecanismo de replicación sería semiconservativo (Khan, 2005). En el segundo modelo propuesto, una vez restablecida la replicación como indicado anteriormente (**Figura 5 c1**), debido a la extrusión del DNA de nueva síntesis y por migración de la burbuja de replicación, la síntesis de DNA seguiría con un mecanismo de replicación conservativo (**Figura 5 c5 y c6**) dando lugar a un DNA concatémico (Formosa & Alberts, 1986).

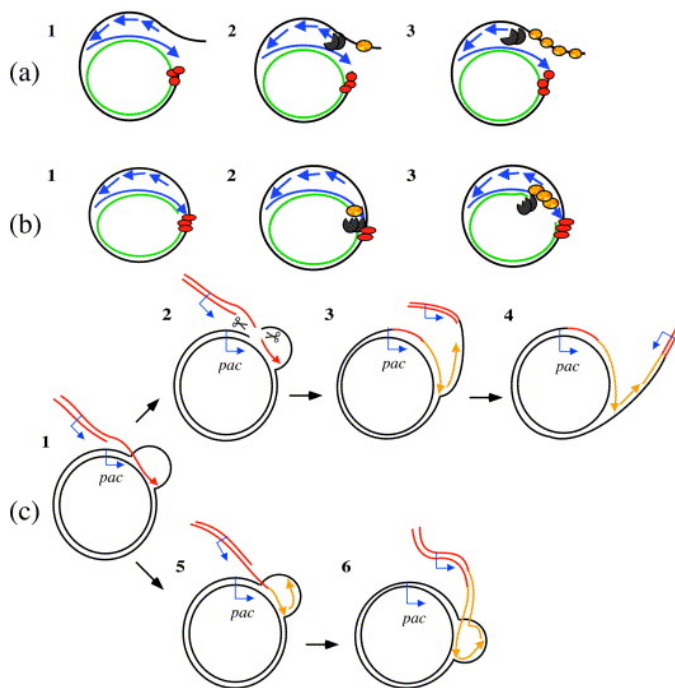


Figura 5. Modelos de iniciación de la replicación concatémica en SPP1. La proteína G38P (óvalos rojos) unida a *oriR* detiene la progresión del replisoma produciendo una parada de la replicación y una rotura o en la cadena retrasada **(a)** o en la cadena líder **(b)**. La exonucleasa dimérica 3'-5' G341P (comecocos) procesa el extremo, la recombinasa G35P (óvalos amarillos) filaminta sobre el extremo 3' de DNA de cadena sencilla y a partir de este sustrato invade otra molécula de SPP1. En **(a)** y en **(b)** el molde para la síntesis de la cadena líder se muestra en verde, el molde de la cadena retrasada en negro y el DNA de nueva síntesis en azul. Se sugieren dos modelos de iniciación de la replicación

concatémica **(c)**. En el primer modelo se recluta el replisoma y se restablece la replicación, a continuación una endonucleasa resuelve el bucle-D y tras una ligación se genera el sustrato apropiado para una replicación concatémica, tipo σ , que se llevará a cabo con un mecanismo semiconservativo (pasos 2-4). En el segundo modelo, tras el restablecimiento de la replicación, ocurre una extrusión del DNA de nueva síntesis (migración de la burbuja de replicación) que permite que la replicación del DNA se lleve a cabo con un mecanismo conservativo, sin necesidad que una endonucleasa específica catalice un corte en la estructura bucle-D (pasos 5 y 6). En **(c)** el molde de DNA se muestra en negro, el DNA de nueva síntesis en amarillo y el DNA que proviene de la horquilla de replicación parada en rojo. Figura tomada del paper de Martínez-Jiménez 2005 (Martínez-Jiménez, *et al.*, 2005).

1.3 La replicación concatémica en otros virus

En muchos virus la síntesis de concatémeros es esencial para la encapsidación del DNA en las procápsides. Esto ocurre en SPP1, como ejemplo en bacterias Gram positivas, en el fago λ en bacterias Gram negativas, y en Herpes virus simplex tipo I en eucariotas. En estos virus, el genoma se replica una o más veces mediante el sistema θ , y sucesivamente sufre un cambio a replicación tipo σ . Esta última replicación proporciona un alto número de copias del genoma, unidas entre sí. El cambio de replicación requiere proteínas

codificadas por el propio virus que tienen un papel similar a algunas proteínas de recombinación del huésped que se encargan de reparar daños en el DNA por recombinación homóloga. Por tal razón este tipo de replicación se denomina “dependiente de recombinación” o “RDR”.

1.3.1 RDR en otros virus con genoma circular

a) El bacteriófago λ

Al infectar la célula huésped *E. coli*, el DNA del bacteriófago λ circulariza por los extremos cohesivos (12-pb 5'-protuberantes) que posee. En las primeras fases empieza la transcripción de la proteína organizadora del replisoma O y del cargador de helicasa P a partir del promotor temprano P_R (Taylor & Wegrzyn, 1995, Wegrzyn & Wegrzyn, 2005, Weigel & Seitz, 2006). A continuación, O une la región λ -ori e interacciona con P que a su vez recluta la helicasa DnaB del huésped (Dodson, *et al.*, 1986). La proteína P deja el complejo nucleoproteico con la ayuda de la chaperonas DnaK, DnaJ y GrpE, dejando la helicasa DnaB activada (Liberek, *et al.*, 1988). El fago aprovecha de la maquinaria de replicación de la célula para replicar su genoma. La replicación procede bidireccionalmente y unidireccionalmente en las cepas silvestres de *E. coli*, y unidireccionalmente en cepas defectivas en DnaA. Tras 5 o 6 rondas de replicación tipo θ , a los 15 minutos aproximadamente, empieza la replicación tipo σ o replicación concatémica (Taylor & Wegrzyn, 1995). Sin embargo, otra teoría afirma que ambos tipos de replicación podrían empezar simultáneamente (Better & Freifelder, 1983). La replicación concatémica requiere la actividad de sistema Red en células mutantes en el gen *recA*. El sistema Red se compone de 2 proteínas de recombinación que se localizan bajo el mismo promotor P_L : la exonucleasa Red α , la recombinasa Red β . La exonucleasa Red α degrada de forma procesiva el extremo 5' del DNA de doble cadena, la proteína Red β une DNA de cadena sencilla y promueve el anillamiento de cadenas complementarias (Bastia & Sueoka, 1975, Better & Freifelder, 1983, Dodson, *et al.*, 1986).

El mecanismo de cambio de replicación tipo θ a replicación tipo σ aún no se conoce. Se ha propuesto que el cambio de replicación pueda depender de la concentración de DnaA (Taylor & Wegrzyn, 1995, Wegrzyn & Wegrzyn, 2005). Se observó que concentraciones limitantes de DnaA libre provocan una disminución de la actividad transcripcional del promotor P_R del fago. Según el modelo, la menor activación del origen determina que

sólo un complejo DnaB helicasa se cargue en el origen λ , llevando a cabo una replicación unidireccional y de tipo σ . Otros estudios sugieren que el cambio de replicación se debe a la inestabilidad del complejo λ -O. Según este modelo las proteínas ClpP/ClpX median la proteólisis de la proteína organizadora del replisoma O. Sin embargo, mutaciones en los genes *clpP* y *clpX* han revelado que estas dos proteínas sólo presentan un leve efecto sobre la direccionalidad de la replicación y la formación de intermedios de replicación tipo σ (Narajczyk, *et al.*, 2007). Finalmente, también se ha propuesto que el cambio de replicación de tipo θ a tipo σ se podría dar, como en el caso del fago SPP1, por la fuerte unión de la proteína organizadora del replisoma O al origen de replicación. Su unión crearía una barrera que bloquearía la maquinaria de replicación dando lugar a una rotura de la doble cadena (Lo Piano, *et al.*, 2011).

b) Herpes simplex virus tipo I (HSV-I)

En HSV-I aún no se conoce el mecanismo con el cual se genera el cambio de replicación de tipo θ a replicación concatemérica. Sin embargo, se ha propuesto un modelo de RDR para HSV-I que se basa en la actividad de la proteína ICP8. ICP8 es una metaloproteína de 128 kDa y es esencial para la replicación vírica. ICP8 une DNA de cadena sencilla con alta afinidad y de forma cooperativa. También une DNA de cadena doble pero la afinidad es menor. Además, se ha demostrado que puede catalizar anillamiento de cadenas homólogas e intercambio de cadenas (Bortner, *et al.*, 1993). Otra proteína que podría estar implicada en el cambio de replicación RDR es UL12. UL12 es una proteína con actividad exonucleasa 5'-3'. Se ha demostrado que ICP8 y UL12 son capaces de promover el anillamiento de un DNACs circular en un DNACd lineal (Reuven, *et al.*, 2004). A través de este mecanismo, como en el modelo propuesto por SPP1, se podría formar una estructura bucle-D que sirviera como base para el reensamblado de la horquilla (Nimonkar & Boehmer, 2003). Recientemente se ha propuesto un modelo alternativo de RDR para HSV-I, según el cual el concatémoro se generaría a partir de un intermedio ramificado que sería resuelto por proteínas virales y celulares como ocurre en la replicación del bacteriófago T4 (Wilkinson & Weller, 2003).

1.3.2 RDR en virus con genoma lineal

a) El bacteriófago T4

En el bacteriófago T4 también se generan concatémeros mediante una replicación dependiente de recombinación. La replicación comienza en uno de los orígenes en un DNA lineal, por lo que cuando la horquilla de replicación alcanza el extremo del

cromosoma se acumulan DNA de doble cadena con extremos 3' protuberantes. La proteína gp32 une el extremo de cadena sencilla, y UvsY facilita el cargado de UvsX sobre el DNA revestido de gp32. La proteína UvsX cataliza la invasión de cadena en un DNA homólogo formando un bucle-D (**Figura 6, 1**). La horquilla de replicación se reensambla gracias a la interacción entre gp32 y el cargador de helicasa gp59 que carga la helicasa gp41 (**Figura 6, 2**). Cuando se completa la replicación de la molécula lineal, la invasión de una segunda molécula genera una complicada red de intermedios ramificados que se resuelve por la actividad de la proteínas Endo VII resolvasa y UvsW traslocasa, que generan un concatémoro linear (**Figura 6, 3 y 4**).

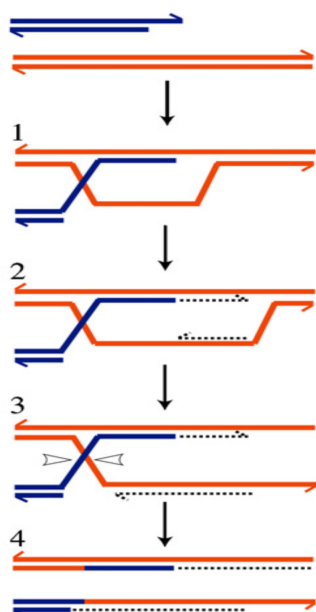


Figura 6. Modelo de RDR del bacteriófago T4. Durante la replicación del bacteriófago T4 se acumulan moléculas de DNA con extremos 3' protuberantes (indicados con una flecha). La invasión de cadena en una región homóloga de otra molécula fágica genera un bucle-D. 1. A partir de un bucle-D comienza la replicación semiconservativa. 3. La migración de rama y la ligación crean una estructura de Holliday que podría ser cortada en cualquiera de las dos orientaciones (se muestra sólo una). 4. La replicación de la molécula de DNA es completa. La invasión de cadena de otra molécula genera una red complicada de intermedios que tras su resolución da lugar a una molécula de DNA concatémica (Lo Piano, *et al.*, 2011).

1.4 Resolvasas de estructuras de Holliday de bacteriófagos

El intermediario de recombinación más común que se genera en procesos de recombinación homóloga es el intermediario de cuatro cadenas conocido como estructura de Holliday. Las resolvasas de estructuras de Holliday (HJ) son enzimas que cortan

específicamente estructuras de DNA ramificadas y que están presentes en todos los organismos (Sharpless, *et al.*, 2001, Declais & Lilley, 2008). Las resolvasas de fagos más caracterizadas son la resolvasa RusA, codificada por el profago DPL12 de *E. coli*, la endonucleasa EndoVII codificada por el bacteriófago T4, y la endonucleasa EndoI codificada por el bacteriófago T7 (Sadowski, 1974, Lilley & White, 2001, Declais & Lilley, 2008). Estas enzimas presentan diferente estructura sin embargo, su mecanismo de acción es similar. Las enzimas son dímeros que reconocen específicamente el intermedio HJ, y lo distorsionan antes de catalizar el corte (Declais & Lilley, 2008).

a) RusA y Rap

La proteína RusA de *E. coli* (Bolt, *et al.*, 2000), codificada por el profago críptico DLP12 de *E. coli* (Chan, *et al.*, 1997, Sharples, *et al.*, 2002, Macmaster, *et al.*, 2006), es una DNA endonucleasa que resuelve los intermedios de Holliday que se forman durante los procesos de recombinación genética y reparación del DNA (Sharples, *et al.*, 1994). RusA fue identificada mediante el aislamiento de mutantes capaces de suprimir los defectos en reparación causados por mutaciones en los genes *ruv*. Se descubrió que los mutantes resistentes al daño expresaban el gen *rusA*. *In vivo* la expresión de RusA es muy escasa (Mahdi, *et al.*, 1996).

RusA es una proteína de 14 kDa que forma un homodímero (Chan, *et al.*, 1997). Como RuvC resuelve, en presencia de iones metálicos bivalentes, estructuras de Holliday sintéticas mediante un doble corte que genera DNA de doble cadena mellado (Sharples, *et al.*, 1994, Chan, *et al.*, 1997). Sin embargo no requiere la presencia del complejo RuvAB, y tampoco la presencia de la helicasa RecG que, como RuvAB, cataliza la migración de cadena de estructuras de Holliday (Lloyd & Sharples, 1993, Mandal, *et al.*, 1993, Whitby, *et al.*, 1993, Mahdi, *et al.*, 1996). La catálisis depende de tres aminoácidos altamente conservados localizados en el medio del dominio C-terminal de la proteína (Asp70, Asp72 y Asp91) (Bolt, *et al.*, 1999). Estos residuos parecen estar implicado en la coordinación del catión Mg^{2+} (Rafferty, *et al.*, 2003). Otros estudios revelan que la Lys76 es esencial para la actividad de corte de la proteína, sin embargo no se requiere para la unión de la proteína a DNA (Bolt, *et al.*, 2000). Como RuvC, pero a diferencia de otras endonucleasas codificadas por fagos, RusA une y corta preferentemente estructuras de Holliday en una secuencia específica. Sin embargo, a diferencia de RuvC, RusA une otras estructuras de DNA ramificadas y DNAs de doble cadena. La proteína RusA corta preferentemente en el punto de intersección de las ramas el dinucleótido CC en 5' (Sharples, *et al.*, 1994, Chan, *et al.*, 1998).

La proteína Rap es codificada por el bacteriófago λ a partir del gen *rap* que se encuentra en la región no esencial *ninR*. Rap es una endonucleasa capaz de cortar diferentes estructuras, entre ellas estructuras de Holliday y bucles-D (Sharples, *et al.*, 1998, Sharples, *et al.*, 1999). Generalmente la proteína cataliza un corte en el centro de las estructuras de Holliday, pero a diferencia de lo que se observa con las resolvasas RuvC y RusA, al corte no es simétrico y no parece específico de secuencia. Sin embargo, al incubarse la proteína con estructuras de Holliday muy largas, se ha observado que la proteína puede producir un corte simétrico en dicha estructura (Sharples, *et al.*, 2004). La proteína Rap parece estar implicada en el proceso de recombinación mediados por las proteínas Red (Sharples, *et al.*, 1998).

b) Endo VII

La proteína EndoVII (también llamada gp49) no es esencial para la replicación dependiente de recombinación del bacteriófago T4, sin embargo se requiere para que las estructuras ramificadas de concatémeros puedan “desramificarse” para ser correctamente empaquetadas. Se ha observado recientemente que *in vivo*, la proteína Endo VII resuelve estructuras tipo Y y X, permitiendo la formación de sustratos que pueden ser empaquetados por acción de la proteína portal (Dixit, *et al.*, 2011). La proteína portal gp20 interacciona con EndoVII (Golz & Kemper, 1999). Además, se ha demostrado que Endo VII interacciona físicamente con UvsX y UvsY, y que estas dos proteínas inhiben su actividad de corte de HJ (Birkenkamp-Demtroder, *et al.*, 1997).

c) Endo I

La proteína Endo I, también llamada gp3, es la resolvasa de estructuras de Holliday codificada por el fago T7 y pertenece a la misma superfamilia que las resolvasas tipo RecU de Firmicutes (Ayora, *et al.*, 2004), o a las resolvasas de Holliday de Arquea (White, 2011). No es una proteína esencial, pero se sabe que corta intermedios de replicación y recombinación con baja especificidad, con lo que puede cortar la horquilla de replicación del huésped para dar lugar a un extremo de doble cadena. Este extremo será digerido por la exonucleasa 6 del fago para dar lugar a nucleótidos que se requieren para la replicación del bacteriófago (Sadowski, 1974). Mutantes en la proteína gp3 muestran un fenotipo de parada de replicación (Chung, *et al.*, 1990), sin embargo, no se ha descrito si esta parada de la replicación se debe a que esta proteína participa en los procesos de RDR o si sólo se requiere para proveer nucleótidos. Se desconoce si Endo I interacciona con otras enzimas de replicación y/o recombinación.

2. OBJETIVOS

Los objetivos propuestos en este trabajo son los siguientes:

I. Determinar los requerimientos necesarios para que empiece la replicación dependiente de recombinación de SPP1. En particular se pretende estudiar:

- qué origen de replicación SPP1 utiliza el bacteriófago SPP1
- qué tipo de replicación se da a partir de cada origen.
- qué papel juegan *in vivo* proteínas de recombinación homóloga en la replicación del bacteriófago SPP1

II. Determinar el interactoma de la proteína G36P

- Definir el significado de la interacción entre G35P y G36P

III. Encontrar si SPP1 codifica por una proteína resolvasa capaz de resolver los intermedios de recombinación que pueden formarse en el cambio de replicación de tipo θ a tipo σ

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

a) Cepas

Las cepas utilizadas y construidas en este trabajo se detallan en la siguiente tabla.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [<i>F'</i> <i>proAB lacIq²ΔM15</i> (Tet)]	
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F- dmc ompT hsdS</i> (rB- mb) <i>gal</i> (DE3)	Stragene (Studier, <i>et al.</i> , 2009)
<i>B. subtilis</i> BG214	<i>amyE, attSPB, metB5, sigB37, trpC2, xin-1, aatICEBs1, attICEBs</i>	(Yasbin, <i>et al.</i> , 1980)
<i>B. subtilis</i> BG193	<i>amyE, aatSPB, aatICEBs1, dnaB37, metB5, sigB37, trpC2, xin-1</i>	(Yasbin, <i>et al.</i> , 1980)
<i>B. subtilis</i> LAS195	<i>PY79 amyE::Pxyl I- SclI</i> (<i>cat</i>)	(Simmons, <i>et al.</i> , 2007)
<i>B. subtilis</i> BS1531	<i>amyE::Pxyl I- SclI</i> (<i>cat</i>), <i>attSPB, metB5, sigB37, trpC2, xin-1</i>	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> BS1532	<i>amyE::Pxyl I- SclI</i> (<i>cat</i>), <i>dnaB37, attSPB, metB5, sigB37, trpC2, xin-1</i>	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> FLB23	<i>trpC2, ssb3⁺</i>	(Costes, <i>et al.</i> , 2010)
<i>B. subtilis</i> FLB22	<i>trpC2, ssbΔ35</i>	(Costes, <i>et al.</i> , 2010)

Tabla 1. Cepas

b) Reactivos y materiales

En la **Tabla 2** se muestran los reactivos y los materiales utilizados.

PRODUCTOS	CASA COMMERCIAL
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Columna de cromatografía Micro Bio-spin, Hidroxiapatita, Pulsed Field Certified Agarose	Bio-Rad

DNA Taq polimerasa	Biotools
IPTG, Rifampicina	Calbiochem
LiteAblot western blot kit	Euroclone
Hidrolizado de caseína, Metanol	Fluka
Membrana nylon N+, Membrana PVDF, AlkPhos Direct labelling reagent with CDP Star, Sephadex G-50, Q-Sepharosa, GFX PCR DNA and gel band purification kit	GE-Healthcare
SDS, Sulfato amónico, Urea	ICN
anti-IgG de rata coniugados a peroxidasa.	Jackson ImmunoResearch
Enzimas de restricción, Fragmento de Klenow de DNA polimerasa I	MBI Fermentas
Ac. sódico trihidrato, Ac. bórico, Ac. clorhídrico, Ac. fórmico, Ac. tricloroacético, Alcohol isoamílico, Azul de bromofenol, Azul de Coomassie, Cloroformo, Cloruro magnésico hexahidratado, Cloruro de hierro, Cloruro de zinc, Dimetilsulfóxido (DMSO), Etanol absoluto, Fenol, Glicina, Hidróxido de sodio, Isopropanol, L-metionina, Titriplex (EDTA), D/L Triptófano, Tritón X-100, Urea.	Merck
Filtros de 0.05µm (tipo VM), 0,45µm (tipo HAWP)	Millipore
Glicerol	MP Biomedicals
Enzimas de restricción, T4 polinucleótido quinasa (PNK), T4 DNA ligasa, DNA polymerase I (Klenow fragment)	New England Biolabs
Ácido acético, Vaselina filante	Panreac
[α³²P]-dATP, [γ³²P]-ATP	Perkin-Elmer
Wizard Plus kit extracción de plásmido	Promega
Agarosa, Triptona, Extracto de levadura, Agar bacteriológico	Pronadisa
Kit de extracción de plásmido	Quiagen
Fast Start Taq DNA, Proteinasa K, Ribonucleasa A (RNase A)	Roche
Acrilamida, Bisacrilamida	Serva
Ampicilina, Bromuro de etidio, Cloranfenicol, Deoxynucleotides trifosfato (dNTPs), 1,4-ditiotreitol (DTT), D-fructosa, Lisozima, Xylene cianol, βmercaptoetanol.	Sigma
QuikChange Site-Direct Mutagenesis	Stratagene
Membranas de diálisis	Spectrum
LB	USB

Tabla 2. Reactivos

En la **Tabla 3** se muestran las secuencias de los oligonucleótidos y en la **Tabla 4** los tampones, utilizados en los experimentos.

NOMBRE	SECUENCIA
A2	5'AGAAACGACAGAGAAACGACACGAAAAAGACAGGAAGACACAGA AACGGATTCCACGATGGCTCGTAGCACTATCAAGGGGACTGCGAGG TTGACTGAGCTCCCACCC 3'
J3.1	5'CGCAAGCGACAGGAACCTCGAGAAGCTTCCGGTAGCAGCCTGAGC GGTGGTTGAATTCCTCGAGGTTCTGTGCTTGCG 3'
J3.2	5'CGCAAGCGACAGGAACCTCGAGGAATTCAACCACCGCTCAAC TCAACTGCAGTCTAGACTCGAGGTTCTGTGCTTGCG 3'
J3.3	5'CGCAAGCGACAGGAACCTCGAGTCTAGACTGCAGTTGAGTCCTG CTAGGAC GGATCCCTCGAGGTTCTGTGCTTGCG 3'
J3.4	5'CGCAAGCGACAGGAACCTCGAGGGATCCGTCCTAGCAAGGGGCTG CTACCGGAAGCTTCTCGAGGTTCTGTGCTTGCG 3'
16-M	5'GACGCTGCCGAATTCTACCAGTGCCTTGCTAGGACATCAGTCCTTA CCTGCAGGTTAC 3'
17-M	5'GGGTGAACCTGCAGGTAAGGGGCTGCTCATCGTAGGTTA GTTGGTAGAATTCGGCAGC 3'
19-M	5'TAAGAGCAAGATGTTCTCACTGATGTCCTAGCAAGGC AC 3'
21	5'ACTAACCTACGATGAGCAGCC3'
22-M	5'TGAGGAACATCTTGCTCTTA 3'
23-M	5'ACTAACCTACGATGAGCAGCCTGAGGAACATCTTGCTCTTA 3'
6	5'ACTAACCTACGATGAG 3'
bm6-a	5'GCGTTACAATGGAACTATTCTTGGCAGTTGCATCCAACG 3'
bm6-b	5'CGTTGGATGCAACTGCCAAGAATAGTGTGCTCAGTTCCAGACG 3'
bm6-c	5'CGTCTGGAAGTACACTATTCTTGGCAAATGGTCGTAAGC 3'
bm6-d	5'GCTTACGACCATTGCGCAAGAATAGTTTCCATTGTAACGC 3'

Tabla 3 Oligonucleótidos

c) Tampones

TAMPÓN	COMPOSICIÓN
A	50 mM Tris HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 15% glicerol
B	50 mM Tris HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 50% glicerol
C	50 mM Tris HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 1 M NaCl, 10% glicerol
D	50 mM Tris HCl pH 7,5, 1 mM DTT, 5% glicerol , 50 µg/ml BSA, 50 mM NaCl.
E	25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 5% glicerol
F	50 mM fosfato, pH 7,5, 5% glicerol, 1 mM EDTA
TAE	40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA
TBT	10mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10mM MgCl ₂
TE	10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0
Tris-Glicina	25 mM Tris, 250 mM glicina pH 8,3

Tabla 4 Tampones

3.2 Métodos

3.2.1 Manipulación de células

a) Obtención de células competentes

Las células competentes de *E. coli* se obtienen creciendo un cultivo en LB en presencia del antibiótico correspondiente a 37 °C en agitación, hasta alcanzar la fase exponencial ($DO_{560} \cong 0,4$). Se centrifugan las células y se resuspenden con CaCl₂ 50 mM. El tratamiento con calcio permeabiliza la membrana de manera que el DNA pueda introducirse de forma pasiva. Las células se conservan a -80 °C en presencia de glicerol 15% hasta su utilización (Hanahan, 1983).

B. subtilis desarrolla competencia natural en condiciones determinadas de crecimiento y nutrientes. Para la obtención de células competentes de *B. subtilis* se crece un cultivo en medio líquido GM1 (SBase1X, glucosa 0,5%, extracto de levadura 0,1%, hidrolizado de caseína 0,02%, MgSO₄ 0,8 mM, D/L-triptófano 0,0025%, L-metionina 0,02%) que se incuba durante 16 h a 30 °C sin agitación. Al día siguiente, el cultivo se diluye hasta una

$DO_{560} \cong 0,05$ en medio GM1 y se incubaba a 37 °C con agitación hasta 90 min después de que alcance la fase estacionaria. Las células se conservan con 15% de glicerol a -80 °C hasta su utilización (Bott & Wilson, 1968). Para inducir la competencia en las cepas termosensibles utilizadas en este trabajo se incubaron las células a 30°C y tras 120 min en fase estacionaria se guardaron en presencia de glicerol a -80 °C.

b) Transformación bacteriana

La transformación de *E. coli* se llevó a cabo siguiendo el protocolo de choque térmico (Hanahan, 1983). Se mezclan 200 µl de células competentes con 10-100 ng del plásmido y se incubaba a 4 °C durante 30 min. Después se da un choque térmico a 42°C durante 1 min, para que los poros de la membrana se abran, y se vuelven a dejar a 4°C durante 2 min para que la membrana se restablezca. Por último se plaquean las células en LB agar con el antibiótico correspondiente.

Las células de *B. subtilis* se transformaron según el método de Bott y Wilson (Bott & Wilson, 1968). Se hace una dilución 1:10 de las células competentes en medio GM2 (GM1 suplementado con 3,3 mM $MgSO_4$ y 0,5 mM $CaCl_2$), y el cultivo se incubaba 1 h a 37 °C (30 °C en el caso de células termosensibles) en agitación. Después se añaden a las células 100-200 ng de DNA y se incuban 1 h en las condiciones anteriores (2 h en células termosensibles). Finalmente se plaquean las células en LB-Agar en presencia del antibiótico correspondiente.

c) Infección de B. subtilis con SPP1

La infección con el fago SPP1 se realizó creciendo un cultivo de *B. subtilis* hasta la $DO_{560} \cong 0,4$ en medio líquido LB en presencia de 10 mM $MgCl_2$. Para la titulación del fago se plaquearon 100 µl de células y 100 µl de fago a diferentes diluciones entre 10^{-7} y 10^{-9} en LB-Agar con 10 mM $MgCl_2$. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 14-16 h. Para la titulación de fagos termosensibles, las placas se incubaron a 30 °C durante 14-16 h.

d) Transducción con SPP1

La transferencia de genes de una cepa de *B. subtilis* a otra, se realizó por medio del fago SPP1 que posee la capacidad de transducción generalizada (Yasbin & Young, 1974). Se crecen células donadoras de *B. subtilis*, en medio líquido LB suplementado con 10 mM $MgCl_2$ y el antibiótico correspondiente hasta la $DO_{560} \cong 0,4$ a 37°C (o a 30°C en el caso de cepas termosensibles) y se infectan con SPP1 con una moi de 10. Tras dos horas y media

de infección, se centrifuga el cultivo durante 10 minutos a 14000 rpm. El sobrenadante, que contiene los fago transductores, se filtra utilizando filtros Millipore de 0,45 μm y se titula como se ha descrito anteriormente. A continuación, se crecen hasta la fase exponencial las células aceptoras de *B. subtilis* en medio líquido LB suplementado con 10 mM MgCl_2 hasta la $\text{DO}_{560} \cong 0,4$ a 37 °C (o a 30 °C en el caso de cepas termosensibles). 500 μl de cultivo se infectan con los fago transductores con una moi entre 1 y 5 y tras 5 minutos de incubación se centrifuga la mezcla. El precipitado se lava con LB sin magnesio para eliminar los restos de fagos y se vuelve a centrifugar durante 1 minuto a máxima velocidad. Los precipitados celulares se resuspenden en medio LB sin magnesio y finalmente se plaquean las células en LB-Agar en presencia del antibiótico correspondiente. La eficiencia de transducción de plásmidos es generalmente de 10^{-5} - 10^{-7} transductores por fago viable, pero incrementa hasta 100/1000 veces si el plásmido tiene homología con el genoma de SPP1 (Deichelbohrer, *et al.*, 1985, Alonso, *et al.*, 1986, Novick, *et al.*, 1986).

3.2.2 Manipulación del DNA

a) Purificación y cuantificación del DNA

El DNA plasmídico se purificó por lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979) o bien usando el kit para purificación de DNA de Quiagen.

La concentración de DNA fue cuantificada por absorbancia a 260 nm y su pureza fue determinada relacionando la absorbancia a 260 y a 280 nm (Sambrook, 1989). La tabla siguiente muestra los plásmidos utilizados y construidos en este trabajo.

PLÁSMIDO	DERIVADO DE	DESCRIPCIÓN Y REFERENCIA
pHP13		Vector lanzadera (Haima, <i>et al.</i> , 1987)
pCB565	pHP13	Contiene el gen 35 de SPP1
pCB783	pHP13	Contiene el gen mutado de 35-S76A
pCB780	pHP13	Contiene el gen mutado de 35-R127A
pCB781	pHP13	Contiene el gen mutado de 35-E248A
pCB782	pHP13	Contiene el gen mutado de 35-K224A
pCB166	pHP13	Contiene las regiones oriL y oriR de SPP1
pET3a		Vector de sobre-expresión (New England Biolabs)
pCB530	pET3a	Contiene el gen 35 de SPP1 bajo promotor inducible por IPTG
pET3a-G35P-S76A	pET3a	Contiene el gen mutado de 35-S76A
pET3a-G35P-R127A	pET3a	Contiene el gen mutado de 35-R127A
pET3a-G35P-K224A	pET3a	Contiene el gen mutado de 35-K224A
pET3a-G35P-E248A	pET3a	Contiene el gen mutado de 35-E248A
pCB596	pET3a	Contiene el gen 36 de SPP1
pET-G36P-deltaC9	pET3a	Sobre-expresa la proteína mutada G36P de SPP1 que carece de los últimos 9 aa del extremo C-terminal
pET-G36P-deltaC15	pET3a	Sobre-expresa la proteína mutada G36P de SPP1 que carece de los últimos 15 aa del extremo C-terminal
pET-G36P-deltaC21	pET3a	Sobre-expresa la proteína mutada G36P de SPP1 que carece de los últimos 21 aa del extremo C-terminal
pET15b		Vector de sobre-expresión (Novagen)
pET-G44P	pET15b	Contiene el gen 44 de SPP1 clonado entre los sitios NcoI-BamHI bajo promotor inducible por IPTG.
pT712		Vector de sobre-expresión (Addgene).
pBT217	pT712	Contiene el gen <i>dnaG</i> de <i>B. subtilis</i>
pBT233	pSM19035	(Ceglowski, <i>et al.</i> , 1993)
pBT233-oriR	pBT233	Contiene la región oriR de SPP1
pBT233-oriL	pBT233	Contiene la región oriL de SPP1
pBT233-400HR	pBT233	Contiene 400 pb de homología con SPP1 (la región del gen 35 BsaAI-EcoRV)
pBT233-SceI	pBT233	Contiene la secuencia de corte de la endonucleasa SceI
pCB166	pHP13	Contiene las regiones oriL y oriR de SPP1
pCB30	pUC18	(de la Hoz, <i>et al.</i> , 2000)

Tabla 5: Plásmidos

b) Marcaje radioactivo de DNA

El marcaje de DNAs en el extremo 5' se lleva a cabo mediante la incubación con T4 polinucleótido quinasa (PNK) en presencia de [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP durante 45' a 37°C. El marcaje de DNAd se realizó rellenando con DNA Pol I (fragmento Klenow) los extremos 5' protuberantes en presencia de 0,2 mM dCTP, dGTP, dTTP y 20 μCi (3 $\mu\text{Ci/nmol}$) de [$\alpha^{32}\text{P}$]-dATP durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las enzimas se inactivaron a 65°C durante 20 min. El exceso de nucleótidos se eliminó pasando la mezcla de reacción por una columna Sephadex G-50 (Sambrook, 1989).

c) Obtención de DNA de doble cadena y estructuras de Holliday sintéticas

El anillamiento de oligonucleótidos complementarios se realizó en tampón fosfato 100 mM pH 7,5 con una estequiometría 1:2 oligo-radioactivo: oligo-frío en número de moléculas. Se calentó la muestra a 100 °C durante 2 min y se dejó bajar la temperatura lentamente hasta 30 °C. Con el mismo protocolo anillamos los oligonucleótidos que se utilizaron para la construcción de estructuras de Holliday sintéticas y bucles D (**Figura 7**).

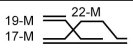
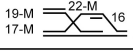
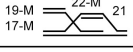
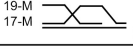
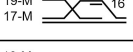
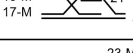
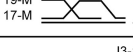
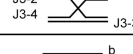
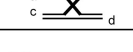
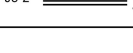
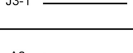
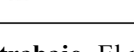
Abreviación sustrato	Tipo de sustrato	Estructura + oligos utilizados
DL-A	bucle-D procesado (r-bucle-D)	
DL-B	r-bucle-D parcialmente replicado	
DL-C	r-bucle-D replicado	
DL-D	bucle-D	
DL-E	bucle-D parcialmente replicado	
DL-F	bucle-D replicado	
HJ-23M	Estructura de Holliday 23M	
HJ-J3	Estructura de Holliday J3	
HJ-jbm6	Estructura de Holliday móvil jbm6	
dsDNA	80-pb DNAd	
ssDNA	80-nt DNAs	
ssDNA	114-nt DNAs	

Figura 7. Estructuras de DNA construidas en este trabajo. El nombre de cada oligonucleótido se indica en el extremo 5'. En la estructura HJ-jbm6 el centro móvil se representa con una línea más gruesa.

Cada estructura se cargó en un gel de poliacrilamida del 10% no desnaturizante, y la banda correspondiente a la estructura deseada se cortó y se purificó. El DNA se eluyó mediante la incubación de la banda a 4 °C durante 16 h en tampón 0,5 M Acetato de amonio, 0,1% SDS, 1 mM EDTA y se precipitó con etanol. La concentración de DNA se calculó mediante el contador de centelleo.

d) Mutagénesis dirigida

Los mutantes puntuales del *gen 35* se han conseguido mediante el kit QuikChange Site-Direct Mutagenesis de Stratagene. Como molde se utilizó el plásmido pCB565, que lleva clonado el *gen 35*, y como cebadores, dos oligonucleótidos que contienen la mutación que se quiso introducir, cada uno complementario a una hebra del vector (véase **Tabla 6** donde se indican los cebadores utilizados). Para amplificar el plásmido se utilizó la DNA polimerasa PfuTurbo. Esta polimerasa replica ambas hebras del plásmido sin desplazar los cebadores, dando lugar a varias copias de DNA circular mellado, en las cuales una hebra lleva la secuencia mutada, y la otra la secuencia parental. A continuación, el DNA parental se eliminó con la exonucleasa DpnI, que es específica para el DNA metilado y hemimetilado. Finalmente el DNA de cadena doble circular y mellado se transformó en células competentes de *E. coli* (XL1-Blue).

Mutante G35P	Cebador 1	Cebador 2	Mutación introducida
S76A	5'gaatgtgatacggcagca ct catggggg ctg 3'	5'cagcccccatgagt gt gccgtatcacattc 3'	tca → gca
R127A	5'cttgatctcgtgagag cc ctctggacacgt gag 3'	5'ctcacgtgtccagagg ct ctcacgagatca ag 3'	cgc → gcc
K224A	5'gacgcaatg gc gaaagcacagtcttgc gc 3'	5'gcgcaagactgt gc gttgcgcattgcgtc 3'	aag → gcg
E248A	5'gagtagcggcagac gc acggacagga tcag 3'	5'ctgacctgtccgt gc gtctgccgtactc 3'	gaa → gca

Tabla 6. Cebadores utilizados para la construcción de mutantes de G35P. En rojo se indican las mutaciones introducidas.

Los mutante de delección de *gen 36* de SPP1 se han construido por PCR utilizando como molde el plásmido pCB596. Se utilizaron dos cebadores, uno que anilla en el plásmido aguas arriba del sitio de multiclonado (pET-up), y otro que introduce un codón de stop y un sitio de restricción para la enzima BamHI, que anilla en la región en la que se desea

que termine el gen, aguas abajo (Tabla 7). El gen truncado se insertó, sucesivamente, en un nuevo vector pET3a.

Nombre del cebador	Secuencia
pET-up	5'gatctcgatcccgcgaaatt 3'
G36P-deltaC9	5'gtcggatccatttatttagattgtttacc 3'
G36P-deltaC15	5'tgtggatccatctatgcgaaagg 3'
G36P-deltaC21	5'ataggatccttataaccctcctg 3'

Tabla 7. Cebadores utilizados para la construcción de los mutantes de delección de la proteína G36P. En rojo se indican los codones de stop introducidos.

3.2.3 Obtención de proteínas

a) Sobreexpresión de proteínas

La proteína G34.1P y la subunidad τ de la polimerasa III se sobreexpresaron y se purificaron como se describió anteriormente (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2005) y fueron cedidas por el Doctor Juan Carlos Alonso. La proteína SsbA de *B. subtilis* fue sobreexpresada y purificada por Tribhuwan Yadav según el protocolo descrito (Manfredi, *et al.*, 2008).

Las proteínas G35P y G36P y las respectivas variantes mutantes se sobreexpresaron en la cepa *E. coli* BL21 (DE) pLysS. Los genes codificantes para cada proteína, clonados en el vector pET3a, se transcriben bajo el promotor Φ 10 del fago T7; la ARN polimerasa del fago T7 se induce por IPTG y es resistente a rifampicina, un antibiótico que bloquea la transcripción dependiente de la ARN polimerasa celular. La expresión desde pLysS de la lisozima de T7 suprime la expresión basal de la ARN Pol de T7 inhibiéndola y evitando escapes en la expresión de los genes clonados bajo el promotor ϕ 10 de T7.

En el caso de la proteína G35P y de sus variantes, se inocula un cultivo con una colonia procedente de placa fresca y se incuba 2 h a 37°C. Posteriormente, se diluye el cultivo en medio LB fresco hasta una $OD_{560} \cong 0,05$ y se deja crecer a 37°C con agitación hasta llegar a una $OD_{560} \cong 0,4$. En ese momento se induce la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG 0,2 mM y se incuba el cultivo a 18 °C durante 16 h.

Las proteína G36P, y las otras proteínas purificadas en este trabajo se sobreexpresan en medio LB a 37 °C con agitación hasta una $OD_{560} \cong 0,8$, sucesivamente se añade IPTG 2 mM, y se incuba el cultivo media hora en las condiciones precedentes. Luego, se añade rifampicina a una concentración de 200 µg/ml y se incuba durante 1,5 h más.

En ambos casos la masa celular se recoge mediante centrifugación a 9000 rpm durante 15 min y se conserva a -20 °C.

b) Purificación de proteínas

Purificación de G35P

Los mutantes de la proteína G35P y la proteína silvestre se aislaron resuspendiendo las células en el tampón A con 500 mM NaCl y 2 mM EDTA (cantidad: 5 ml/gramo de células). Todos los pasos de purificación se realizaron a 4°C para evitar la desnaturalización de las proteínas. La lisis se realizó mediante sonicación. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación durante 35 minutos a 18000 rpm. Se precipitó el DNA con polietilenimina (0,01%) y mediante centrifugación (10 minutos a 10000 rpm) separamos la proteína que se quedó en el sobrenadante. La proteína se precipitó con un 45% de saturación de sulfato de amonio. El extracto se resuspendió en tampón A con 500 mM NaCl y 2 mM EDTA y se pasó por una matriz de hidroxipatita (volumen de columna 5 ml). Lavando con diez volúmenes de columna con concentraciones crecientes de tampón fosfato, la proteína silvestre (al igual que los mutantes) eluyó entre 10 y 20 mM fosfato. El eluido se dializó para eliminar el fosfato y para bajar la concentración de NaCl hasta 70 mM. Los contaminantes se eliminaron pasando la proteína por una matriz de intercambio iónico, Q-sepharosa (volumen de columna 2 ml) equilibrada a la misma concentración de sal, G35P no se unió y los contaminantes se quedaron atrapados a la matriz. Finalmente, la proteína pura se concentró en una matriz de fosfocelulosa (volumen 1 ml), de la cual se eluyó a 500 mM de NaCl. Las proteína G35P y sus variantes se dializaron frente al tampón B y 500 mM NaCl y se guardaron a -20°C. La concentración de las proteínas se halló midiendo la absorbancia a 215 nm y 225 nm según el método de Waddell (Wolf, 1982).

Purificación de G36P

Los mutantes de la proteína G36P y la proteína silvestre se purificaron resuspendiendo las células en tampón A con 150 mM NaCl (cantidad: 5 ml/gramo de células). Todos los pasos de purificación se realizaron a 4 °C para evitar la desnaturalización de las proteínas. La lisis fue realizada mediante sonicación y los restos celulares se eliminaron por

centrifugación (30 minutos a 18000 rpm). Se precipitó el DNA con polietilenimina (0,02%) y se centrifugó 10 minutos a 10000 rpm. La proteína se quedó en la porción insoluble y se resuspendió en el tampón de lisis subiendo la concentración de NaCl a 300 mM. La proteína se solubilizó y se precipitó posteriormente con un 30% de saturación de sulfato amónico. El precipitado fue resuspendido nuevamente en el tampón de lisis con un 30% de saturación de sulfato amónico y la proteína precipitó casi pura. Se dializó frente a tampón A con 50 mM NaCl y para eliminar contaminantes se pasó el extracto por una columna de Q-sepharosa (volumen 2 ml) equilibrada con el mismo tampón. Tanto la proteína silvestre como los mutantes eluyeron entre 150 y 200 mM NaCl. La proteína pura se concentró en otra matriz Q-sepharosa (volumen 0,5 ml) de la cual se eluyó a 500 mM NaCl. La proteína G36P y sus variantes se dializaron frente al tampón B y 500 mM NaCl y se guardaron a -20°C.

La concentración de las proteínas se halló midiendo la absorbancia a 215 nm y 225 nm según el método de Waddell (Wolf, 1982).

Purificación de G44P

Las células se resuspendieron en tampón F con 200 mM NaCl (cantidad: 5ml/gramo de células) y se lisaron mediante sonicación. Se centrifugó durante 35 minutos a 18000 rpm para eliminar los restos celulares y la proteína G44P quedó como la mayoría de las proteínas en el precipitado. Solubilizamos la proteína G44P lavando con tampón F con 500 mM NaCl y la precipitamos con un 45% de saturación de sulfato amónico. Se cargó la proteína en una columna de hidroxapatita (volumen 5 ml) equilibrada con fosfato 8 mM. Después se lavó la matriz con diez volúmenes de columna con concentraciones creciente de fosfato en tampón F con 1 M NaCl, hasta eluir la proteína entre 30 mM y 60 mM de fosfato. Se juntaron los eluidos y se dializó hasta 250 mM NaCl. La proteína se cargó en una columna Q-sepharosa (volumen 1 ml) y se eluyó pura a 400 mM NaCl. La concentración de la proteína se halló midiendo la absorbancia a 215 nm y 225 nm según el método de Waddell (Wolf, 1982). Todos los pasos de purificación se realizaron a 4°C para evitar la desnaturalización de las proteínas.

Purificación de DnaG

Las células se resuspendieron en tampón C (cantidad: 5ml/gramo de células) y se lisaron mediante sonicación. Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación (35 minutos a 18000 rpm). La fracción soluble se diluyó hasta 100 mM de NaCl y se precipitó el DNA con polietilenimina (0,02%) mediante 10 minutos de centrifugación a

10000 rpm. A continuación, la proteína se precipitó con un 70% de saturación de sulfato amónico, se dializó para bajar la concentración de sal hasta 50 mM NaCl, y se cargó en una columna fosfocelulosa (volumen 2 ml). La proteína eluyó entre 75 mM y 150 mM NaCl. El eluido se diluyó hasta 75 mM NaCl y se pegó a una matriz de heparina (volumen 1 ml), de la cual eluyó a 100 mM NaCl. Finalmente se volvió a dializar la proteína frente a 50 mM NaCl y se concentró en una matriz fosfocelulosa (volumen 1 ml), de la cual eluyó pura a 1 M NaCl. Se dializó frente a tampón B con 300 mM NaCl y se conservó a -20 °C. La concentración de la proteína se halló por absorbancia a 280 nm siendo el coeficiente de extinción molar $45520 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.2.4 Ensayos *in vivo*

a) Replicación de los plásmidos, Southern blot y cuantificación

Las cepas de *Bacillus subtilis* BG214, o bien las cepas termosensibles BG193, que llevan los plásmidos pBT233, pBT233-*oriR*, pBT233-*oriL*, pBT233-400HR fueron crecidas a 30 °C en agitación en medio líquido LB suplementado con MgCl_2 10 mM. A la $\text{OD}_{560} \cong 0.3$ las cepas se incubaron a 50 °C durante 30 minutos y sucesivamente fueron infectadas con fago SPP1, o sus variantes (*tsB3* o *tsI20F*), con una moi de 10. Las muestras fueron recogidas a tiempo 0 y a los 15, 30 y 60 min tras la infección y centrifugadas. Los precipitados fueron guardados a -20 °C.

Las cepas de *Bacillus subtilis* BS1531, que llevan integradas en el cromosoma la *SceI* endonucleasa, fueron crecidas en medio mínimo S750 (Vasanth & Freese, 1979): K_2HPO_4 - KH_2PO_4 5 mM pH 7.0, sulfato amónico 10 mM, MgCl_2 10mM, CaCl_2 0,7 mM, MnCl_2 5 μM , FeCl_3 5 μM , ZnCl_2 1 μM , triptófano 0,04 mg/ml, metionina 0,04 mg/ml, fructosa 0,5%, glutamato 1mg/ml y MOPS 10 mg/ml) a 37 °C hasta alcanzar la $\text{OD}_{560} \cong 0.4$. En este momento, donde indicado, se añadió xilosa 0,5% y se infectó con SPP1 (moi $\cong 10$). Las muestras fueron recogidas a tiempo 0 y a los 15, 30 y 60 min tras la inducción y centrifugadas. Los precipitados fueron guardados a -20 °C.

La extracción del DNA se realizó según el método de Viret (Viret & Alonso, 1987). Las células se resuspendieron en tampón glucosa (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8,0) y se incubaron con lisozima 0,5 mg/ml, RNasa 0,2mg/ml durante 30' a 37°C, luego se desproteinizó la muestra tratando con proteinasa K 0,8 mg/ml y SDS

(0,8%) durante 30' a 37°C. Las muestras fueron cargadas en gel de agarosa 0.8 % y corridas en TAE durante 4 h a 80 V en geles teñidos con Bromuro de Etidio.

En todos los casos, el DNA fue transferido a membrana de nitrocelulosa (Membrana nylon N+, GE-Healthcare) por capilaridad (Southern, 1975) y revelado utilizando como sonda un fragmento de 400 pb obtenido por PCR utilizando como molde el plásmido pCB30 (de la Hoz, *et al.*, 2000) que tiene clonado la región 6377-6754 del plásmido pBT233. El sistema de marcaje y de detección usado fue el AlkPhos de GE Healthcare. La cuantificación de las Unidades Arbitrarias de DNA plasmídico amplificado se realizó mediante el programa Quantity One (Bio-Rad).

b) Inmunodetección de la expresión de la proteína G44P *in vivo*

Las células de *B. subtilis* BG214 se crecieron en medio líquido LB suplementado con MgCl₂ 10 mM hasta la fase exponencial OD₅₆₀ ≈ 0,4 y se infectaron con SPP1 con una *moi* igual a 10. Cada cinco minutos 1 ml de cultivo se centrifugó, y el precipitado fue resuspendido en 100 µl de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5% SDS, 150 mM NaCl, lisozima 1 mg/ml). Se incubó 30 min a 37 °C y posteriormente las células se lisaron mediante sonicación. Después el lisado se centrifugó a 14000 rpm durante 30 min, y se cargaron 50 µl del sobrenadante en un gel SDS-PAGE al 12,5%. Luego se transfirieron las proteínas a una membrana PVDF para su inmunodetección usando anticuerpos primarios policlonales anti-G44P y anticuerpos secundarios anti-IgG de rata acoplados a peroxidasa. El revelado se llevó a cabo usando el kit LiteAblot de Euroclone.

3.2.5 Ensayos *in vitro*

a) Interacción proteína-DNA

Microscopía electrónica

La interacción entre la proteína G38P y el plásmido pCB166 que posee los dos orígenes de replicación de SPP1 *oriL* y *oriR* se visualizó por microscopía electrónica. Se incubaron concentraciones decrecientes de la proteína G38P (de 200 nM a 12,5 nM) con 0,68 nM de DNA durante 15 min a temperatura ambiente en el tampón 20 mM Trietanolamina (TEA), 100 mM NaCl y 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT. Posteriormente los complejos se fijaron con 0,2 % glutaraldehído durante 15 min a 37 °C. Las muestras se depositaron en una superficie de mica y se sombrearon con platino. Luego se cubrieron

con una película de carbono y se observaron al microscopio Philips CM100 (FEI Company, Hillsboro, Oregon).

Ensayos de retraso en gel

La interacción DNA-proteína fue medida por la variación de migración del DNA en un gel de poliacrilamida frente a un campo eléctrico. Si el DNA está acomplejado con una o más proteínas migra de forma más lenta, mientras suele tener una movilidad alta cuando se encuentra libre.

Para llevar a cabo las reacciones de unión de G35P (o G36P) y variantes a DNAs se utilizó el tampón D, en presencia de EDTA 2,5 mM o bien en presencia de 5 MgCl₂, según el experimento. Se incubó el oligonucleótido de 114 nt (0,4 nM) descrito en la **Tabla 3**, marcado radioactivamente en el extremo 5', con concentraciones crecientes de la proteína en estudio durante 10 o 15 min, según el ensayo, a 37°C. En los ensayos en que participan ambas proteínas, G35P y G36P, incubamos el DNAs previamente con G35P durante 10 min y sucesivamente añadimos la proteína G36P. En los ensayos de inmuno-retardo añadimos posteriormente anticuerpos policlonales anti G35P o G36P (antisuero diluido 1:20 o 1:10, respectivamente, en PBS 1X) e incubamos durante 5 min a 37°C. Las muestras se cargan en un gel de poliacrilamida al 5% en tampón Tris 25 mM, glicina 250 mM pH 8 y corren a 180 V durante 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente se seca el gel y se revela por autorradiografía.

La interacción entre la proteína G44P y las diferentes estructuras de DNA (0,2 nM) construidas se realizó en tampón D con 1 mM EDTA. Se incubó la proteína durante 15 min a 37 °C y posteriormente las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 6% en tampón TAE 1X y se dejaron correr a 180 V durante 90 min a temperatura ambiente. Se secó el gel y se reveló por autorradiografía.

Ensayos de unión a filtros de nitrocelulosa

Se realizaron experimentos de unión a filtro de nitrocelulosa para analizar la estabilidad de algunos complejos DNA-proteína. Se incubaron 8 nM de G36P, o de sus variantes, en el tampón D con 5 mM MgCl₂, con un oligo polydT de 80 nt (0,5 nM) marcado radioactivamente, durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadió un exceso (1:80) de polydT frío y a tiempo 0, 5, 10 y 20 minutos, y se tomaron alícuotas de 20 µl que se diluyeron en 1 ml del mismo tampón. Las muestras se filtraron con filtros de nitrocelulosa 0,45 µm tratados previamente con KOH (0,5 M) y los filtros se lavaron con

2 ml de tampón D con 5 mM MgCl₂. Sólo el DNA unido a proteínas se queda retenido en el filtro. Los filtros se secaron y la radioactividad se midió mediante un contador de centelleo. Los datos obtenidos se corrigieron sustrayendo la radioactividad del DNA marcado que se retiene en el filtro en ausencia de proteína. Se consideró como 100% del DNA retenido, el oligo polydT de 80 nt (0,5 nM) marcado, que tras la precipitación con TCA 10%, se retiene en el filtro. Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

Ensayos de anillamiento

Se utilizó un DNA de cadena doble de 416 pb, fragmento obtenido por digestión DraIII-EcoRI del plásmido pGEM 3Z-f(+), que se purificó y se marcó radioactivamente con Klenow y α -³²P dATP. Desnaturalizamos mediante calor (5 min a 100°C) el DNA y lo ponemos rápidamente en hielo. Sucesivamente, incubamos 0,5 nM de DNA desnaturalizado con G35P (o sus variantes) 10 min a 37 °C y posteriormente, donde indicado, añadimos G36P durante 10 min más en las mismas condiciones (o bien añadimos antes G36P y luego G35P) en un volumen total de reacción de 20 μ l. Realizamos la reacción en tampón 25 mM Tris HCl pH 7,5, 5 mM β -mercaptoetanol, 50 μ g/ml BSA, 50 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂ y antes de cargar las muestras en un gel de poliacrilamida al 5% en tampón Tris 25 mM, glicina 250 mM, pH 8 se desproteinizó mediante la adición de proteinasa K 2,5 mg/ml, SDS 2% y EDTA 30 mM durante 20 min a 37 °C. La electroforesis se realizó a 180 V durante 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente se secó el gel y se reveló por autorradiografía.

Ensayos de corte de estructuras de Holliday

Se incubó en un volumen de 10 μ l el DNA marcado radioactivamente (0,2 nM) con G44P (10 nM) en tampón D con 10 mM MgCl₂. Tras 30 min de incubación a 37°C se paró la reacción añadiendo 9 μ l de tampón desnaturalizante que lleva formamida 90% y 25 mM EDTA. Las muestras se cargan en un gel de poliacrilamida al 20% desnaturalizante (urea 8 M) y se deja correr durante 2,5/3 h a 1600V. El revelado se hace mediante autorradiografía. Cuando las reacciones se analizan en geles no desnaturalizantes, las muestras se cargan en un gel ndPAGE al 6%, y se dejan correr 2 h a 180 V y se revela mediante autorradiografía.

Ensayos de replicación por círculo rodante en vitro

Estos ensayos se realizaron en colaboración con la Doctora Elena Seco (este laboratorio), y con el grupo del profesor McHenry (Universidad de Colorado). Se incubaron durante 10 minutos a 37 °C: 30 nM G40P (hexámero), 180 nM G39P (dímero), 300 nM G38P (monómero), 8 nM DnaG (monómero), 15 nM DnaE (monómero), 20 nM PolC (monómero), 25 nM τ_4 , 25 δ nM, 25 nM δ' , 24 nM β_2 , 30 nM G36P (tetramero), 5 nM DNA molde, 350 mM de ATP, 100 mM de CTP, GTP y UTP, 48 μ M de dNTPs (excepto 18 μ M dCTP o dGTP para la síntesis de la cadena líder y de la atrasada respectivamente), y α -[32 P] dCTP o α -[32 P] dGTP (0,2 μ Ci por reacción). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 12,5 μ l en tampón BsRC que contenía 4% de glicerol, NaCl 19 mM y 4 mM de Tris-HCl pH 7,5. En primer lugar, se preparó la mezcla de enzimas en tampón BsRC, que contiene todos los componentes proteicos, y dos mezclas con sustrato compuestas por el molde de DNA, rNTPs y dNTPs y α -[32 P] dCTP o α -[32 P] dGTP (para la medición de la síntesis de la cadena líder y de la retrasada, respectivamente). La reacción se inicia cuando se mezclan las enzimas con el correspondiente sustrato. Después de la incubación, se añadió un volumen igual de tampón de parada compuesto por 40 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,2% de SDS, 100 mM de EDTA y 50 μ g/ml de proteinasa K y se incubó nuevamente durante 20 min a 37 °C. Sucesivamente, para eliminar los dNTPs no incorporados, se pasó la mezcla de reacción por unas columnas empaquetadas con la matriz Sephadex G-50. Finalmente se midió la síntesis de DNA mediante un contador de centelleo.

b) Interacción proteína-proteína***Precipitación con sulfato amónico***

Las interacciones entre G36P y distintas proteínas implicadas en replicación y/o recombinación se han estudiado mediante ensayos de precipitación con sulfato amónico, utilizando el protocolo descrito para analizar la interacción de RecG de *E. coli* con SSB (Buss, *et al.*, 2008).

Incubamos la proteína 2 μ g G36P, o sus variantes, sola o con otra proteína (2 μ g) en estudio en 40 μ l de tampón E durante 15 min en hielo y posteriormente añadimos 145 μ l de tampón E con sulfato amónico a una concentración final de 1,8 M (que corresponde al 37% de saturación). Incubamos 5 minutos en hielo y centrifugamos 1 min a 14000 rpm. Descartamos los sobrenadantes, lavamos con 20 μ l de tampón E con 1,8 M final de sulfato amónico y corremos, en un gel de acrilamida-SDS, los precipitados que se

resuspendieron en tampón de carga 1X. Se dejó correr el gel 1 h a 35 mA y el gel se tiñó con Coomassie. La concentración de proteína precipitada se cuantificó con el programa Quantity One (Bio-Rad).

4. RESULTADOS

4.1 Papel de los orígenes de replicación en RDR

4.1.1 G38P une *in vitro* *oriL* y *oriR* y los aparea.

El comienzo de la replicación requiere el reconocimiento de un origen de replicación por parte de la proteína organizadora del replisoma. Resultados anteriores indicaban que la replicación tipo θ comienza cuando múltiples copias de G38P se unen al origen de replicación *oriL* situado en medio del propio gen *38* en un DNA superenrollado negativamente (Pedre, *et al.*, 1994). El origen de replicación *oriL* está formado por cinco repeticiones de dos tipos de 10 pb (cajas A y B) situadas antes de una región de 30 pb rica en AT. *In vitro* se ha demostrado que la proteína G38P es capaz de unirse también a otra región denominada *oriR*, que está formada por cuatro cajas A y B seguidas de la región rica en AT. Sin embargo, G38P muestra *in vitro* una afinidad por *oriL* 3-4 veces mayor que por *oriR* (Missich, *et al.*, 1997). Hasta el momento se desconoce cual es la función de *oriR* *in vivo*. El modelo actualmente propuesto postula que la replicación de SPP1 comienza por un mecanismo tipo θ desde *oriL*, y que la proteína G38P unida a *oriR* actúa de barrera de la síntesis iniciada en el otro origen, lo que da lugar a una rotura del DNA (**Figura 5**) (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2005).

Para analizar el funcionamiento del comienzo de la replicación de SPP1, se quiso comprobar por microscopía electrónica si G38P unía preferentemente uno de las dos regiones *ori* cuando ambas están presentes en la misma molécula. Para ello, utilizamos el plásmido pCB166 que contiene, en la misma orientación que en SPP1, las regiones *oriL* y *oriR*, separadas por 1,4 Kb aproximadamente. En la **Figura 8** se muestra que cuando se incubaba el plásmido pCB166 (0,68 nM) con altas concentraciones de G38P (200 nM), la proteína une casi la totalidad de las moléculas de DNA en dos regiones definidas que corresponden con *oriL* y *oriR* y a partir de éstos se extiende formando agregados alargados (**Figura 8** A, B y C). Bajando la concentración de G38P hasta 12,5 nM se observa (**Figura 8** D, E y F) que parte de las moléculas de DNA están libres de proteína. Sin embargo, G38P sigue uniendo la mayoría de las moléculas de plásmido formando dos complejos en forma de bola que corresponderían a la proteína unida a *oriL* y a *oriR*. En algunas de las moléculas se observa que G38P se extiende a partir de estas regiones

formando agregados. En una minoría de las moléculas se observa G38P unida a una de las regiones *ori* formando un único complejo en forma de bola. Bajo las condiciones probadas no parece que G38P una preferentemente una de las dos regiones. Además, se observa que G38P aparea las regiones *oriL* y *oriR* incluso a concentraciones limitantes de proteína.

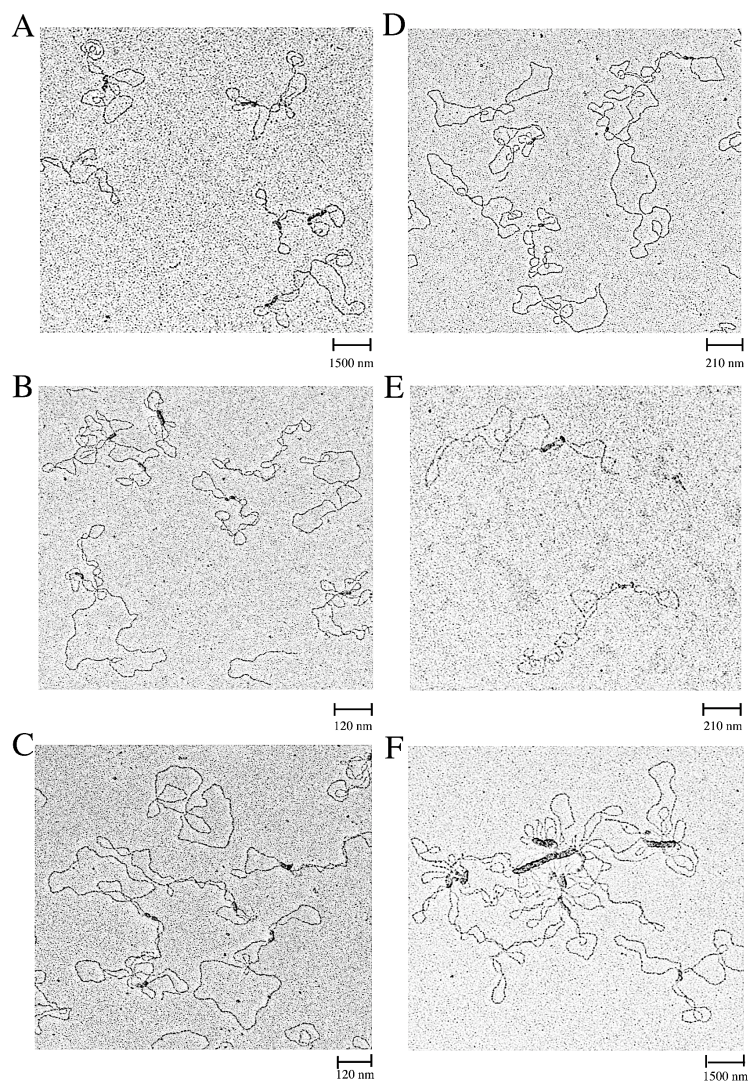


Figura 8. Visualización mediante microscopía electrónica de la unión de G38P a las regiones *oriL* y *oriR*. El plásmido pCB166 (0,68 nM) que contiene en orientación directa las regiones *oriL* y *oriR*, separadas aproximadamente 1,4 Kb, se incubó durante 15 min a temperatura ambiente con G38P 200 nM (en A, B y C) y 12,5 nM (en D, E y F) en tampón 20 mM TEA, 100 mM NaCl y 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT. Posteriormente los complejos se fijaron con 0,2 % glutaraldehído durante 15 min a 37 °C.

4.1.2 La replicación de alto peso molecular requiere un origen de replicación *in vivo*

Mediante microscopía electrónica se observó que la proteína G38P une ambas regiones *oriL* y *oriR*. Se decidió corroborar si *in vivo* el bacteriófago SPP1 utiliza ambas regiones para llevar a cabo su replicación. Para determinar *in vivo* si la replicación concatémica o la replicación tipo σ requieren *oriR* y/u *oriL*, se utilizó el plásmido pBT233 (Ceglowski, *et al.*, 1993) donde fueron clonadas distintas regiones de SPP1 (ver más abajo) y la cepa de *B. subtilis* BG193, que lleva la mutación termosensible *dnaB37* (Levine, *et al.*, 1987). La replicación del plásmido pBT233 es de tipo θ y es dependiente de la proteína DnaB, que es un componente del replisoma bacteriano (Lioy, *et al.*, 2010). En el mutante termosensible *dnaB37*, al pasar los cultivos a temperatura no permisiva, se consigue bloquear la replicación plasmídica debida a la maquinaria de replicación celular; por lo tanto, al infectar las células con el fago SPP1 en estas condiciones, se analiza sólo la replicación iniciada por las proteínas virales.

En primer lugar se realizaron controles en los que la cepa silvestre, llevando el plásmido pBT233 (wt-pBT233), y la cepa *dnaB37*, con el plásmido pBT233 (*dnaB37*-pBT233) fueron crecidas a 30 °C en agitación en medio líquido LB suplementado con 10 mM MgCl₂. A la OD₅₆₀ \cong 0.3 las cepas se incubaron a 50 °C durante 30 minutos y sucesivamente fueron infectadas con el bacteriófago SPP1 silvestre con una moi de 10. Tras distintos tiempos de infección (0, 15, 30 y 60 min) fue extraído el DNA intracelular total. El DNA se cargó en un gel de agarosa del 0,8% y mediante tinción con bromuro de Etidio en la **Figura 9 A**, se observa, que la cantidad del DNA de alto peso molecular aumenta tras el pasar del tiempo de infección. Este DNA de alto peso molecular corre a la misma altura que el DNA del fago SPP1 (carril 9), pero se desconoce si además de la replicación del fago, se pueda estar dando una replicación de plásmido que de lugar a una molécula de alto peso molecular. Para estudiarlo, se analizaron por Southern estas muestras, utilizando como sonda una región de 400 pb que anilla en la región 6377-6754 del plásmido pBT233, por lo que sólo reconoce el DNA plasmídico (**Figura 9**). En la **Figura 9 B** se observa que la concentración del plásmido pBT233 no aumenta tras el pasar del tiempo de infección en la cepa *dnaB37* (carriles 1-4). En cambio, en la cepa silvestre se observa un ligero incremento de la concentración del plásmido pBT233 (carriles 5-8), sin embargo, en ausencia de infección con SPP1, se observó el mismo incremento relativo de DNA plasmídico (dato no mostrado). Los resultados parecen indicar que las proteínas de replicación de SPP1 no pueden iniciar la replicación del plásmido pBT233.

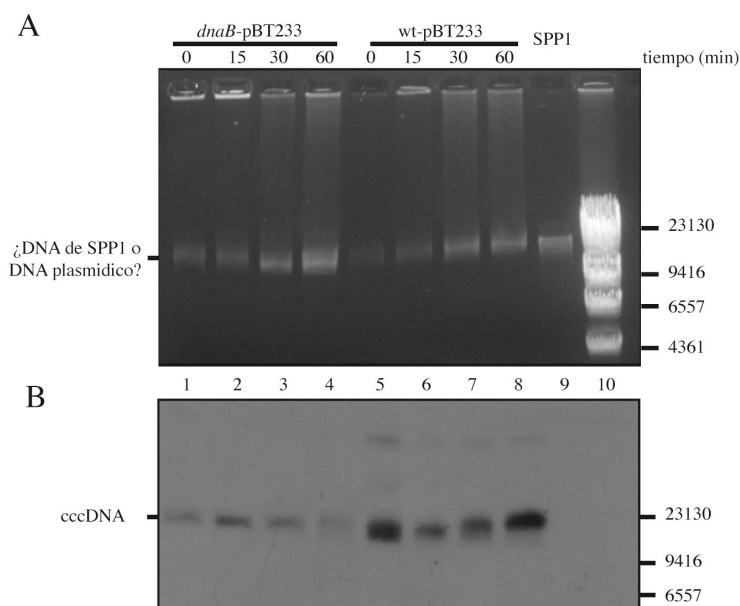


Figura 9. Las proteínas de replicación del fago SPP1 no replican el plásmido pBT233 **A.** Gel de agarosa 0,8% teñido con Br-Et. Se cargó el DNA total extraído de la cepa silvestre de *B. subtilis*, que lleva el plásmido pBT233 (wt-pBT233, carriles 5-8) y de la cepa termosensible *dnaB37*, que lleva el plásmido pBT233 (*dnaB37*-pBT233 carriles 1-4) tras distintos tiempos de infección (0, 15, 30 y 60 min) con SPP1 (moi 10) a temperatura no permisiva. En el carril 9, se cargaron 100 ng de DNA de SPP1 purificado y en el carril 10 se cargó el marcador de peso molecular λ HindIII **B.** Southern blot de las mismas muestras revelado mediante una sonda específica para el plásmido pBT233.

Para comprobar si tanto *oriL* como *oriR* son orígenes de replicación se clonaron en el vector pBT233. El plásmido pBT233-*oriR* fue obtenido insertando en el sitio HpaI del plásmido pBT233 un fragmento de 530 pb (derivado de pCB71 (Missich, *et al.*, 1997), donde 210 pb derivan del *oriR*-SPPI más 320 pb que derivan del plásmido pUC18) y el plásmido pBT233-*oriL* se obtuvo insertando en el sitio HpaI del plásmido pBT233 el fragmento EcoRI de 380 pb del plásmido pBT430 que contiene *oriL* (Missich, *et al.*, 1997).

Las cepas de *B. subtilis* wt-pBT233-*oriL*, wt-pBT233-*oriR*, *dnaB37*-pBT233-*oriL*, *dnaB37*-pBT233-*oriR* fueron crecidas a 30 °C en agitación en medio líquido LB suplementado con 10 mM MgCl₂. A la OD₅₆₀ \approx 0.3 las cepas se incubaron a 50 °C durante 30 minutos y se infectaron con el bacteriófago SPP1 (moi 10). Tras distintos tiempos de infección (0, 15, 30 y 60 min) fue extraído el DNA intracelular total. Además, tras 2 horas de infección se tituló la concentración de SPP1 para averiguar su amplificación.

Los resultados obtenidos indican que tras dos horas de infección el fago SPP1 no incrementa su título inicial ni en las cepas de *B. subtilis* silvestre, ni en las cepas *dnaB37* que contienen el plásmido pBT233-*oriR* o el plásmido pBT233-*oriL*.

Analizando las muestras de DNA intracelular, notamos mediante tinción con bromuro de Etidio que la cantidad de DNA de alto peso molecular aumenta tras el pasar del tiempo de infección (**Figura 10** en A). Sin embargo, analizando por Southern sólo el DNA plasmídico, se observa que, a los 60 minutos de infección, en la cepa silvestre que porta, o bien el plásmido que contiene *oriR*, o bien el plásmido que contiene *oriL*, incrementa la concentración de plásmido en forma de cccDNA, producto de la replicación tipo θ . Además se observa un ligero incremento del DNA plasmídico de alto peso molecular que podría corresponder al producto de la replicación tipo σ (**Figura 10** B carriles de 1 a 4 y de 13 a 16). Si además se para la replicación celular utilizando la cepa mutante *dnaB37*, observamos que a la temperatura no permisiva, tras 60 minutos de infección con SPP1, la maquinaria de replicación del fago es capaz de incrementar aún más, la concentración de cccDNA y de DNA de alto peso molecular de los plásmidos pBT233-*oriR* y pBT233-*oriL*.

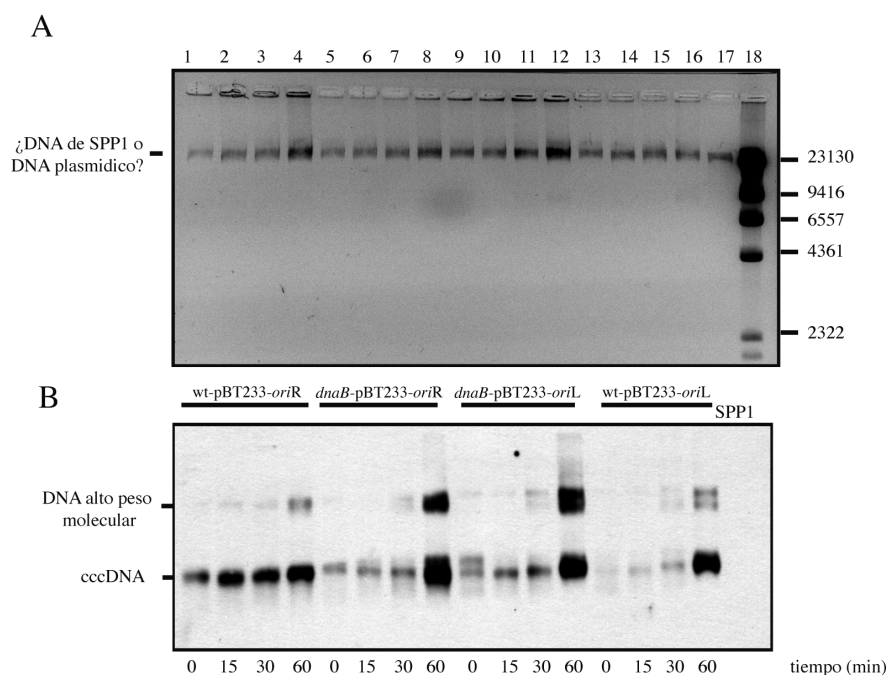


Figura 10. Las proteínas de replicación del fago SPP1 replican el plásmido pBT233-oriR y el plásmido pBT233-oriL. **A.** Gel de agarosa 0,8% teñido con Br-Et. Se cargó el DNA total extraído, tras la infección con SPP1 (moi 10) a temperatura no permisiva, de las cepas *wt*-pBT233-oriR (carriles 1-4), *dnaB*-pBT233-oriR (carriles 5-8), *dnaB*-pBT233-oriL (carriles 9-12), y *wt*-pBT233-oriL (carriles 13-16), respectivamente. En el carril 17, se cargaron 100 ng de DNA de SPP1 purificado. En el carril 18 se cargó el marcador de peso molecular λ HindIII. **B.** Southern blot de las mismas muestras revelado mediante una sonda específica para el plásmido pBT233.

El incremento relativo de DNA plasmídico de alto peso molecular obtenido en tres ensayos independientes se cuantificó mediante el programa Quantity One (Biorad) y se muestra en la **Figura 11**. En la cepa silvestre, tras 60 minutos de infección con SPP1, se observa que la concentración de DNA de alto peso molecular del plásmido pBT233-oriL (o bien del plásmido pBT233-oriR) aumenta aproximadamente 2 veces respecto a la concentración que se halla al tiempo 0 de infección. En ausencia de infección con fago, no se detecta un aumento de DNA plasmídico de alto peso molecular (dato no mostrado) por lo tanto el incremento relativo observado en la **Figura 11** es probablemente debido a la maquinaria de replicación de SPP1. En la cepa termosensible *dnaB37*, a la temperatura no permisiva, se inhibe la actividad de la maquinaria de replicación celular. Infectando con SPP1 las cepas que llevan el plásmido pBT233-oriL (o el plásmido pBT233-oriR) se observa que las proteínas de replicación de SPP1 incrementan a los 60 minutos de infección aproximadamente 9 veces la concentración de DNA plasmídico de alto peso molecular respecto a la concentración que se halla al tiempo 0 de infección. Estos

resultados sugieren que la replicación de DNA de alto peso molecular mediada por las proteínas de SPP1 requiere un origen de replicación fágico, y que aumenta cuando se induce una parada de la replicación.

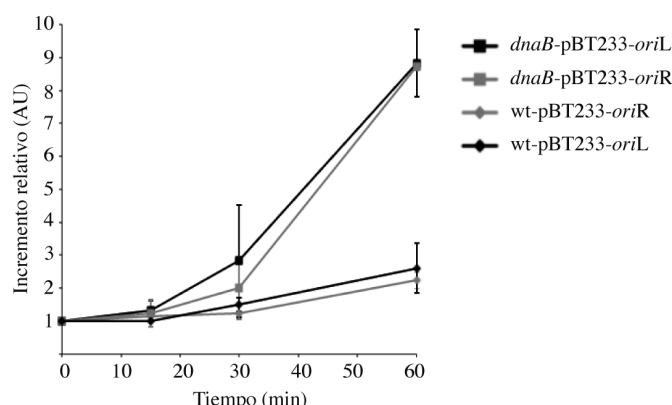


Figura 11. Cuantificación en Unidades Arbitrarias (AU) de DNA plasmídico de alto peso molecular obtenido en las cepas *wt*-pBT233-*oriR*, *wt*-pBT233-*oriL*, *dnaB*-pBT233-*oriR* y *dnaB*-pBT233-*oriL* tras la infección con SPP1 (moi 10) a 50°C. La cuantificación se realizó mediante el programa Quantity One (Bio-Rad) y en la gráfica se muestra la media de los resultados de tres ensayos independientes.

Anteriormente se ha demostrado que, en los plásmidos que replican por círculo rodante, la presencia de regiones de homología con el cromosoma de SPP1 facilita la síntesis de DNA de alto peso molecular (Bravo & Alonso, 1990). Una posibilidad es que la replicación se dispare por la presencia de homología y no por la presencia de un origen de replicación. Para comprobar esta hipótesis se clonó una región de homología al DNA de SPP1 de 400 pb (el fragmento BsaAI-EcoRV de la región EcoRI-4), que tiene un tamaño similar a los fragmentos empleados para clonar *oriL* y *oriR*. El plásmido se denominó pBT233-400HR y se transformó en la cepa silvestre (BG214) y en la mutante termosensible *dnaB37* (BG193).

La cepa de *B. subtilis* wt-pBT233-400HR y la cepa *dnaB37*-pBT233-400HR fueron crecidas a 30 °C en agitación en medio líquido LB suplementado con MgCl₂ 10 mM. A la OD₅₆₀ ≈ 0.3 las cepas se incubaron a 50 °C durante 30 minutos y se infectaron con el bacteriófago SPP1 (moi 10). Tras 2 horas de infección se tituló la concentración de SPP1 en el sobrenadante del cultivo y se observó que el fago SPP1 había incrementado su título aproximadamente 46 veces en la cepa silvestre de *B. subtilis* pBT233-400HR y 45 veces en la cepa termosensible *dnaB37*-pBT233-400HR (media de tres ensayos

independientes). Para averiguar si SPP1 puede iniciar la replicación del plásmido pBT233-400HR se extrajo el DNA intracelular total de las cepas silvestre y de la cepa termosensible *dnaB37* tras distintos tiempos de infección con SPP1 a temperatura no permisiva (0, 15, 30 y 60 minutos). Analizando por Southern el DNA plasmídico, utilizando una sonda específica del plásmido, se observa en la **Figura 12**, que no se detecta ni en la cepa silvestre y ni en la cepa mutante un aumento de DNA de alto peso molecular, por lo tanto la replicación iniciada por las proteínas virales que se detecta en los plásmidos pBT233-*ori*L y pBT233-*ori*R es dependiente de origen.

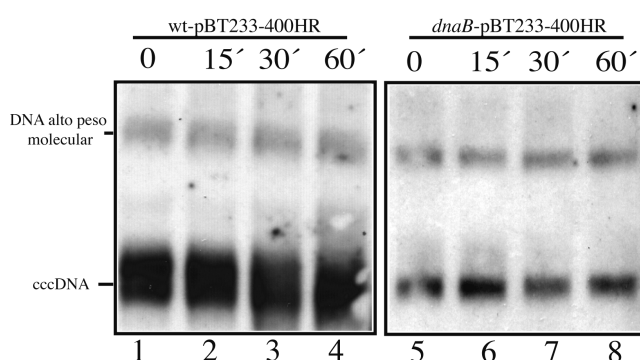


Figura 12. La maquinaria de replicación de SPP1 requiere una región *ori* para ensamblar una replicación de alto peso molecular. Southern blot con sonda específica del plásmido pBT233 de las cepas wt-pBT233-400HR y *dnaB37*-pBT233-400HR tras distintos tiempos de infección (0, 15, 30 y 60 minutos) con SPP1, a temperatura no permisiva.

4.1.3 La replicación de alto peso molecular requiere las proteínas virales G35P y G38P

Utilizando un mutante termosensible del fago SPP1 en G35P (*tsI20F*, (Burger & Trautner, 1978)), inhibimos la actividad de la proteína recombinasa generando una parada de la replicación (Ayora, *et al.*, 2002); por lo que, si el DNA que se sintetiza a partir del plásmido pBT233-*ori*R en la cepa *dnaB37* a temperatura no permisiva es producto de replicación dependiente de recombinación, no debería de verse tal síntesis infectando con un mutante termosensible en G35P.

Infectando con el fago mutante *tsI20F* la cepa wt-pBT233 y wt-pBT233-*ori*R se observa en la **Figura 13 A** que, o bien la maquinaria de replicación de la célula (en la cepa wt), o bien la maquinaria de replicación de SPP1 (en la cepa wt, y exclusivamente en la cepa *dnaB37*), replican el plásmido pBT233 o el plásmido pBT233-*ori*R, mediante un mecanismo tipo θ , generando moléculas de cccDNA. La maquinaria de replicación viral no parece necesitar la proteína G35P para llevar a cabo la replicación tipo θ . Sin embargo,

en la cepa wt-pBT233-*oriR* no se observa síntesis de DNA plasmídico de alto peso molecular (carriles 5-8 de la **Figura 13 A**). Este mismo resultado se observa infectando la cepa *dnaB37*-pBT233-*oriR* con el fago tsI20F, a temperatura no permisiva (carriles 15-18 de la **Figura 13 A**). En ausencia de G35P, la maquinaria de replicación del fago no genera DNA de alto peso molecular en presencia del origen de replicación *oriR* (**Figura 10 A** carriles 15-18). Por lo tanto la replicación masiva de alto peso molecular observada anteriormente (**Figura 10**) requiere G35P, y es una replicación dependiente de recombinación.

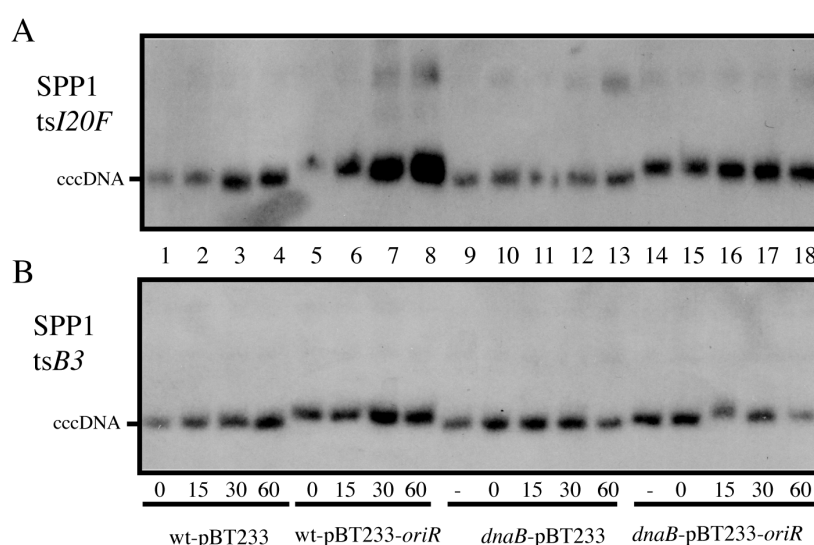


Figura 13. A y B: La replicación de alto peso molecular del plásmido pBT233-*oriR* requiere las proteínas G35P y G38P. Southern blot con sonda específica del plásmido pBT233. DNA de los distintos plásmidos, en la cepa silvestre o en la cepa *dnaB37* (llevadas a temperatura no permisiva), extraídos a los tiempos indicados tras la infección con SPP1 tsI20F (mutante en G35P) en A o con tsB3 (mutante en G38P) en B. En los carriles 9 y 14 se muestra el DNA extraído antes de llevar la temperatura del cultivo a 50°C y de infectar con SPP1.

Para ver si la replicación tipo θ y la replicación dependiente de recombinación son específicas de la región "*ori*" y requieren G38P unido a él, se hizo el mismo ensayo pero, infectando las cepas wt-pBT233, wt-pBT233-*oriR*, *dnaB37*-pBT233, *dnaB37*-pBT233-*oriR* con el mutante de SPP1 tsB3, mutante de G38P termosensible (Missich, *et al.*, 1997).

En las cepas que contienen el plásmido pBT233-*oriR*, en ausencia de G38P, no se observa un aumento de cccDNA del plásmido (carriles 5-8 y 15-18). Además, en la

Figura 13 se observa que infectando con el mutante en G38P la cepa *dnaB37*-pBT233-*oriR*, a temperatura no permisiva, las proteínas virales no generan DNA de alto peso molecular y no replican masivamente el plásmido (**Figura 13 B** carriles 15-18). Estos resultados indicarían que, *in vivo*, la replicación tipo θ y la replicación dependiente de recombinación requieren la proteína organizadora del replisoma de SPP1.

Se repitió el mismo ensayo, infectando con los mutantes *tsB3* y *tsI20F* la cepa *dnaB37*-pBT233-*oriL*. En ausencia de G38P, o G35P, aunque se induzca una parada de la replicación, no se observa replicación masiva de DNA de alto peso molecular del plásmido pBT233-*oriL*. Sin embargo, en ausencia de G35P, la replicación tipo θ no está afectada (**Figura 14** carriles 1-4), sólo se bloquea en ausencia de G38P (**Figura 14** carriles 5-8).

Los dos orígenes de replicación parecen tener el mismo papel *in vivo*.

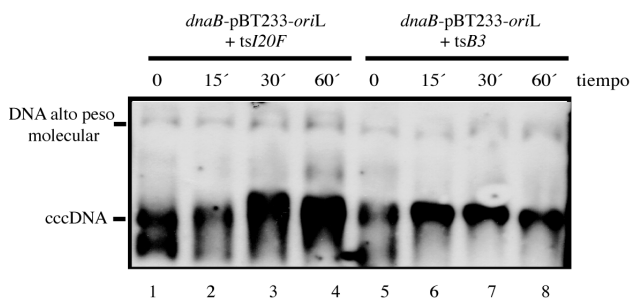


Figura 14. La replicación de alto peso molecular del plásmido pBT233-*oriL* requiere las proteínas G35P y G38P. Southern blot con sonda específica del plásmido pBT233. DNA del plásmido pBT233-*oriL* en la cepa *dnaB37* (llevada a temperatura no permisiva), extraído a los tiempos indicados tras la infección con SPP1 *tsI20F* (de 1 a 4) ó con *tsB3* (de 5 a 8).

4.1.4 La replicación de alto peso molecular se dispara tras la rotura de la doble cadena de DNA

En la cepa *dnaB37* en presencia de *oriL* u *oriR*, cuando se infecta con SPP1 a temperatura no permisiva, observamos más replicación de alto peso molecular que en la cepa silvestre. Nuestra hipótesis es que *in vivo* la replicación del fago comienza en uno de los orígenes y que al llegar la maquinaria de replicación al otro origen, la presencia de G38P fuertemente unida a él genera una parada de la replicación, una regresión de la horquilla y un corte por una resolvasa de estructuras de Holliday, lo que da lugar a una rotura de la doble cadena de DNA que sería procesada por G34.IP y G35P, y que generaría la formación de un bucle-D (**Figura 5**). Es posible que en la cepa *dnaB37* la

parada de la replicación producida al pasar a la temperatura no permisiva genere una rotura de doble cadena de DNA como se ha observado en *E. coli* (Michel, *et al.*, 1997) y sea esta rotura la que determine el cambio de replicación de tipo θ a tipo σ .

Para comprobar si una rotura de doble cadena genera replicación de alto peso molecular se introdujo en el plásmido pBT233 el sitio de corte de la endonucleasa *SceI* (Simmons, *et al.*, 2007). Luego, por trasducción se insertó en el cromosoma de *B. subtilis* el gen que codifica para la enzima de restricción *SceI*. El gen se encuentra en el *amy* locus y su expresión se induce en presencia de xilosa (Simmons, *et al.*, 2007).

La cepa de *B. subtilis* que lleva integrado en el cromosoma el gen que codifica la endonucleasa *SceI* se denominó *B. subtilis* BS1531. En esta cepa se transformó el plásmido pBT233-*SceI* y la células fueron crecidas a 30 °C en agitación en medio mínimo S750, suplementado con MgCl_2 10 mM. A la $\text{OD}_{560} \cong 0.3$ se añadió al cultivo xilosa (0,5%) y al mismo tiempo la células se infectaron con el bacteriófago SPP1 (moi 10). Tras distintos tiempos de infección (0, 15, 30 y 60 min) fue extraído el DNA intracelular total.

En la **Figura 15** analizamos por Southern la replicación del plásmido pBT233-*SceI* y observamos que infectando las células con SPP1 la síntesis de DNA de alto peso molecular aumenta tras el paso del tiempo (**Figura 15** carriles 5-8, 13-16). Sin embargo, en células no infectadas con SPP1, no se observa un aumento de la concentración de DNA de plásmido de alto peso molecular (**Figura 15** carriles 1-4, 9-12). Independientemente de la inducción con xilosa, las células que se infectan con SPP1 disparan la replicación de DNA de alto peso molecular del plásmido pBT233-*SceI*. Este efecto podría ser debido a un escape del promotor de la *SceI* endonucleasa, puesto que en la cepa wt-pBT233 no se observó replicación de DNA de alto peso molecular (**Figura 9**). Este resultado nos indica que la maquinaria de replicación del bacteriófago no requiere una origen de replicación para disparar la replicación tipo σ , siempre y cuando se produzca una rotura previa de la doble cadena de DNA.

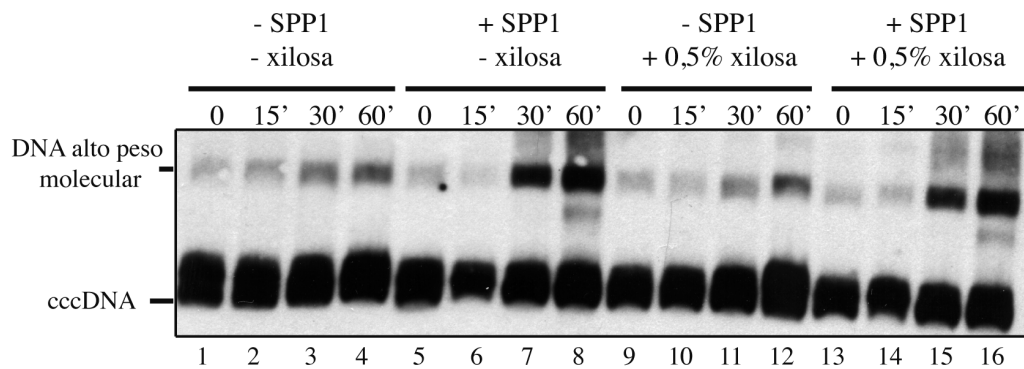


Figura 15. La rotura de la doble cadena de DNA dispara la replicación de alto peso molecular mediada por proteínas virales. Southern blot con sonda específica del plásmido pBT233. DNA del plásmido pBT233-SceI en la cepa *B. subtilis* BS1531 (que lleva integrado en el cromosoma el gen que codifica para la endonucleasa SceI) extraídos a los tiempos indicados tras la infección con SPP1 y/o la inducción con xilosa (donde indicado).

4.2 Análisis Bioquímico

4.2.1 La proteína G36P

La proteína G36P es una proteína con homología a SSB de *E. coli* (29%) y a SsbA de *B. subtilis* (43%) (Alonso, *et al.*, 1997), proteínas que unen con alta afinidad DNA de cadena sencilla y que actúan como organizadores del replisoma (Shereda, *et al.*, 2008).

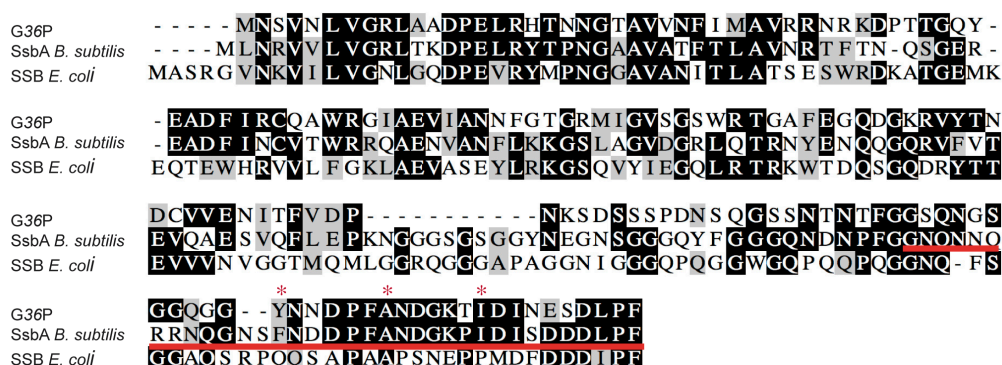


Figura 16. Alineamiento de la proteína G36P de SPP1 con las proteínas SsbA de *B. subtilis* y SSB de *E. coli* (obtenido mediante el programa Boxshade). En negro se muestran los aminoácidos idénticos, en gris los conservados. La línea roja evidencia los 35 aminoácidos que se han deletado en el mutante termosensible *ssbΔ35*. Los tres asteriscos rojos indican los aminoácidos donde termina la secuencia de los mutantes de delección de G36P realizados en este trabajo.

Se ha descrito en *E. coli* y en *B. subtilis* que SSB interacciona mediante el dominio C-terminal con distintas proteínas implicadas en replicación, recombinación y reparación de DNA (Costes, *et al.*, Shereda, *et al.*, 2008, Costes, *et al.*, 2010). La corta secuencia aminoácidica DDDIPF del dominio C-terminal de la proteína SSB de *E. coli* no se requiere para la unión a DNA de cadena sencilla, y no es necesaria para la tetramerización de la proteína (Burger & Trautner, 1978, Curth, *et al.*, 1996, Lecointe, *et al.*, 2007). Sin embargo la interacción de SSB con 14 proteínas, se debe a la presencia de este dominio (Shereda, *et al.*, 2008). El dominio C-terminal de SSB de *E. coli* está altamente conservado en proteínas de unión a cadena sencilla de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Lu & Keck, 2008). En el alineamiento (**Figura 16**) se observa que el dominio C-terminal de SSB de *E. coli* tiene homología con la región C-terminal de las proteínas SsbA *B. subtilis* y G36P de SPP1.

Con el fin de estudiar si *in vivo* el bacteriófago utiliza la proteína de unión a cadena sencilla SsbA de la bacteria, infectamos con SPP1 las cepas de *Bacillus subtilis* FLB23 y FLB22 (Costes, *et al.*, 2010). En estas cepas, el gen esencial *rpsR*, situado inmediatamente después del gen *ssb*, se encuentra bajo el control del promotor inducible por IPTG P_{spac} . Las cepas FLB23 y FLB22 expresan el gen que codifica, respectivamente, para la proteína SsbA silvestre (*ssb3+*) y para la forma mutante *ssbΔ35*, de la cual se han eliminado los últimos 35 aminoácidos del dominio C-terminal. La cepa que contiene la deleción, presenta en medio LB y para la misma OD₅₆₀, una eficiencia de plaqueo 10 veces menor que la cepa control *ssb3+* y es termosensible a temperatura no permisiva (47°C) (Costes, *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta la diferente viabilidad, se infectaron, a temperatura permisiva y no permisiva, las cepa control *ssb3+* y la mutante *ssbΔ35* con SPP1 (moi de 10). Tras dos horas de infección, se tituló el fago y se observó que en ambas cepas el bacteriófago podía replicarse con la misma eficiencia. Este resultado indicaría que SsbA de *B. subtilis* no es esencial para su replicación y que G36P es la proteína tipo SSB que actúa en el replisoma de SPP1.

Para empezar el estudio bioquímico de la proteína G36P se llevó a cabo su purificación, como se describe en materiales y métodos, y se determinó el estado oligomérico mediante geles de acrilamida nativos de gradiente (4-20%). Se cargó la proteína G36P (1,5 μM) en tampón 20 mM Tris HCl, 90 mM NaCl, 5 mM DTT y 5% glicerol, en un gel de gradiente que corrió durante 4 horas, a 4 °C, a 60V. Luego, se tiñó el gel con tinción plata y se observó que la proteína G36P, que en su estado monomérico tiene un peso molecular de 17 kDa, corre en condiciones nativas como un tetrámero, formando una única banda que corre a la altura de 68 kDa aproximadamente.

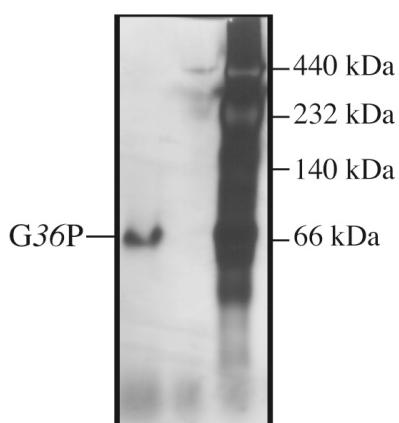


Figura 17. Estado oligomérico de la proteína G36P. Se cargó la proteína G36P (1,5 μM) en tampón 20 mM Tris HCl, 90 mM NaCl, 5 mM DTT y 5% glicerol) en un gel nativo de gradiente 4-20% teñido con tinción de plata. A la derecha se muestra el marcador de peso molecular en kDa.

4.2.2 Construcción y purificación de mutantes de delección de la proteína G36P

Nuestra hipótesis de trabajo es que el dominio C-terminal de la proteína G36P puede estar implicado en la interacción con otras proteínas del replisoma, por lo tanto se construyeron tres mutantes de delección a los que le faltan respectivamente, 9, 15, y 21 aminoácidos de la región C-terminal (véase **Figura 16**). Estos mutantes de delección del gen 36 de SPP1 se construyeron por PCR y se insertaron en el vector de sobreexpresión pET3a. Los mutantes de la proteína G36P se denominaron $\Delta C9$, $\Delta C15$, y $\Delta C21$ y le faltan respectivamente, los últimos 9, 15, y 21 aminoácidos de la región C-terminal. Las proteínas se purificaron según el protocolo descrito en materiales y métodos para la proteína silvestre (**Figura 18**).

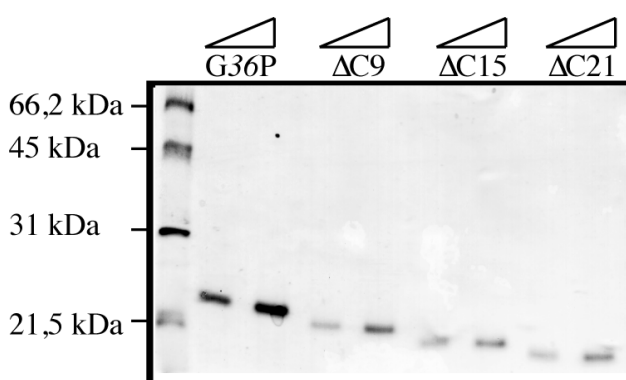


Figura 18. Purificación de los mutantes de delección de la proteína G36P. Se cargaron concentraciones crecientes (200-400 ng) de la proteína silvestre y de cada mutante purificado (100-200 ng) en un gel SDS-PAGE del 15% teñido con azul brillante de Coomassie. A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular en kDa.

El estado oligomérico de los mutantes se determinó corriendo las proteínas purificadas (1,5 y 3 μ M) en tampón 20 mM Tris HCl, 90 mM NaCl, 5 mM DTT y 5% glicerol en geles de poliacrilamida nativos de gradiente (4-20%). Las variantes de G36P, $\Delta C9$, $\Delta C15$, y $\Delta C21$, al igual que la proteína silvestre, corren en condiciones nativas como tetrámeros, mostrando en el gel una única banda de 64 kDa, 61,6 kDa y 58 kDa, respectivamente (**Figura 19**). Este resultado indica que las mutaciones no interfieren en la tetramerización de la proteína. El estudio de la estructura de rayos X de un mutante que contiene el dominio de unión a DNA de cadena sencilla de la proteína SSB de *E. coli* (residuos 1-135) ha revelado que este mutante de delección del dominio C-terminal puede formar tetrámeros (Raghunathan, *et al.*, 1997). Además, se ha demostrado mediante estudios de cristalografía por filtración por gel que los aminoácidos 89-105 desempeñan

un papel clave en el mantenimiento del homotetrámero de la proteína SSB silvestre (Kinebuchi, *et al.*, 1997).

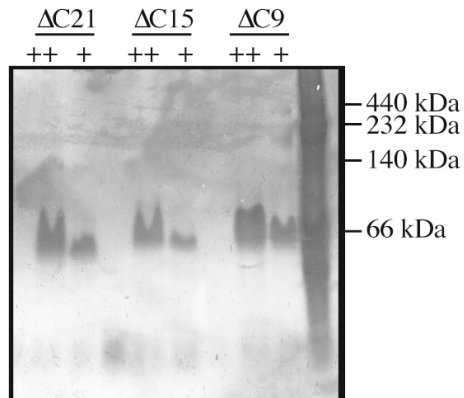
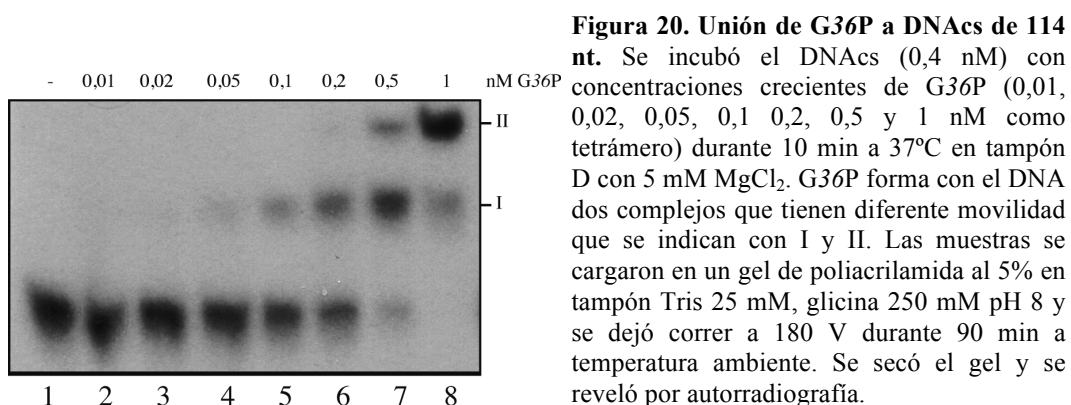


Figura 19. Estado oligomérico de los mutantes de delección de la proteína G36P. Se cargaron 1,5 μ M (+) y 3 μ M (++) de los mutantes Δ C21, Δ C15 y Δ C9 (en tampón 20 mM Tris HCl, 90 mM NaCl, 5 mM DTT y 5% glicerol) en un gel nativo de gradiente 4—20% teñido con tinción con plata. A la derecha se muestra el marcador de peso molecular en kDa.

4.2.3 Capacidad de unión a DNAs de los mutantes de delección de G36P

Para estudiar si los mutantes de delección conservaban la capacidad de unión a DNA de cadena sencilla se realizaron ensayos de unión en gel. Se incubaron durante 10 minutos a 37 °C concentraciones crecientes de la proteína G36P con el oligonucleótido A2 de 114-nt marcado radioactivamente (0,4 nM) en tampón D con 5 mM $MgCl_2$. Luego las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 5% en tampón Tris 25 mM, glicina 250 mM pH 8 y se dejó correr a 180 V durante 90 min a temperatura ambiente. En la **Figura 20** se observa que la proteína G36P silvestre a bajas concentraciones forma un único complejo (complejo I); sin embargo, cuando se incrementa la concentración de proteína aparece un complejo con menor movilidad, llamado complejo II. Probablemente la formación del complejo I se debe a la unión de un tetrámero al DNA, el complejo II a la unión de dos tetrámeros al DNA. La proteína G36P presenta una $K_{app} = 0,2 \pm 0,2$ nM.



Se analizó si los mutantes de G36P conservaban la misma afinidad para el DNAs. El oligo marcado de 114 nt se incubó con concentraciones crecientes de las variantes $\Delta C9$, $\Delta C15$ y $\Delta C21$. En la **Figura 21** se muestra que las variantes no ha perdido su capacidad de unión a DNA de cadena sencilla. En particular, se observó que los mutantes $\Delta C9$ ($K_{app} = 0,25 \pm 0,1$ nM) y $\Delta C15$ ($K_{app} = 0,2 \pm 0,2$ nM) tienen una afinidad de unión similar a la de la proteína silvestre ($K_{app} = 0,2 \pm 0,2$ nM) y forman los dos tipos de complejos. El mutante $\Delta C21$ presenta una afinidad por el DNA de cadena sencilla ligeramente mayor que la proteína silvestre con $K_{app} = 0,1 \pm 0,01$ nM, observándose también la presencia de dos complejos.

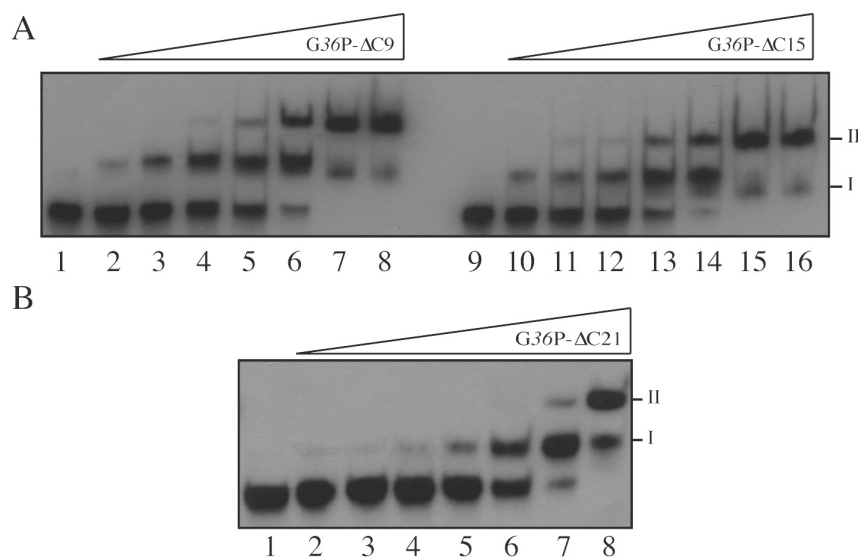


Figura 21. Unión de G36P-ΔC21 a DNAs $[\gamma^{32}\text{P}]$ 114nt. En **A** Se incubó el DNAs (0,4 nM) con concentraciones crecientes (31 pM, 62,5 pM, 125 pM, 250 pM, 500pM, 1 nM, 2 nM en dímeros) de G36P-ΔC9 (del carril 2 al 8) o con G36P-ΔC15 (del carril 10 al 16) durante 10 min a 37°C en tampón D con 5 mM MgCl_2 . Las calles 1 y 9 no llevan proteína. En **B**, se incubó el DNA con concentraciones crecientes (7 pM, 15 pM, 31 pM, 62,5 pM, 125 pM, 250 pM, 500 pM) de G36P-ΔC21 (del carril 2 al 8) durante 10 min a 37°C en tampón D con 5 mM MgCl_2 . La calle 1 no lleva proteína. Las reacciones se pararon con un tampón de carga y se separaron en un gel de poliacrilamida del 5% en tampón Tris-Glicina y se revelaron por autorradiografía.

4.2.4 Papel de la región C-terminal en la estabilidad del complejo DNAs-G36P

Los resultados anteriores indican que los mutantes de delección de G36P tienen la misma afinidad por el DNAs que la proteína silvestre. Se decidió estudiar si la región C-terminal de la proteína G36P podría estar implicada en la estabilidad del complejo DNAs-G36P mediante ensayos de unión a filtros de nitrocelulosa. El oligo polydT de 80 nt (0,5 nM) marcado radioactivamente, se incubó con 8 nM de G36P, o de sus variantes, en un tampón D con 5 mM MgCl_2 . Luego, se añadió un exceso (1:80) de polydT frío (tiempo 0), y se tomaron muestras después de 5, 10 y 20 minutos, diluyendo 20 μl de reacción en 1 ml del mismo tampón frío. A continuación, las muestras se filtraron con filtros de nitrocelulosa 0,45 μm y los filtros se lavaron con 2 ml de tampón D con 5 mM MgCl_2 . Sólo el DNA unido a proteínas se queda retenido en el filtro, por lo tanto, midiendo la radioactividad, mediante un contador de centelleo, se puede cuantificar

cuanto DNA de cadena sencilla marcado queda unido a la proteína, tras la adición de un competidor. La **Figura 22** muestra que la proteína G36P silvestre forma un complejo poco estable con el DNA de cadena sencilla: entre los 5 y los 20 minutos sólo se mantiene un $\cong 15\%$ del complejo. Analizando los mutantes de delección se observa que conforme aumenta el tamaño de la delección, la estabilidad del complejo disminuye. El mutante $\Delta C21$ tiene una estabilidad del complejo 20 veces menor respecto a la proteína silvestre.

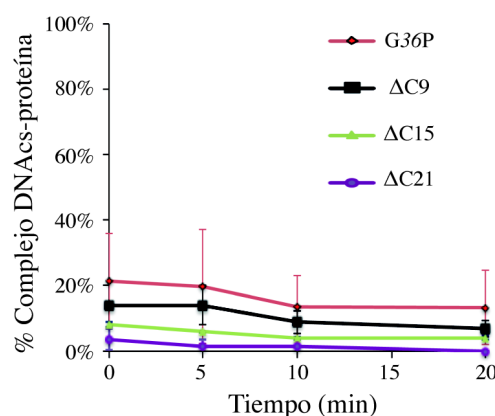


Figura 22. Estabilidad del complejo DNA-proteína. Media de tres experimentos independientes de unión a filtro de nitrocelulosa. Se incubaron con un oligo polydT de 80 nt marcado radioactivamente (0,5 nM) 8 nM de G36P, o de sus variantes, en el tampón D con 5 mM $MgCl_2$, durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente, se añadió un exceso (1:80) de polydT frío y a tiempo 0, 5, 10 y 20 minutos, y se diluyeron 20 μ l de reacción en 1 ml del mismo tampón. Las muestras se filtraron con filtros de nitrocelulosa 0,45 μ m y los filtros se lavaron con 2 ml de tampón D con 5 mM $MgCl_2$. Los filtros se secaron y la radioactividad se midió mediante un contador de centelleo. Se consideró como 100% del DNA retenido el oligo polydT de 80 nt (0,5 nM) marcado, que tras la adición de TCA 10%, se retiene en el filtro.

4.2.5 Interacción de G36P y de $\Delta C21$ -G36P con proteínas del replisoma de SPP1.

En *E. coli*, se ha demostrado que la proteína SSB interacciona por lo menos con 14 proteínas implicadas en replicación y recombinación, y esa interacción es a través del dominio C-terminal ácido (Shereda, *et al.*, 2008). En *B. subtilis*, el dominio C-terminal ácido se requiere para la interacción con al menos 12 proteínas (Costes, *et al.*, 2010).

Hasta el momento sólo se ha descrito la interacción entre G36P y G35P (Ayora, *et al.*, 2002) de la que se desconoce la región de interacción. La región C-terminal de G36P también presenta una serie de residuos ácidos conservados (**Figura 16**) de forma que, por similitud con las proteínas SSB de *B. subtilis* y *E. coli*, se postulaba que este dominio estaría implicado en la interacción con las proteínas que actúan en el replisoma de SPP1.

Durante la purificación se observó que la proteína G36P precipitaba a baja concentración de sulfato amónico (37%), mientras que a esta concentración la mayoría de las proteínas se mantenían solubles. Utilizamos esta característica de G36P para estudiar las posibles interacciones que podrían existir entre la proteína de unión a cadena sencilla y otras proteínas implicadas en la replicación del fago. Se ensayó la interacción de G36P con las proteínas de replicación codificadas por SPP1: la helicasa G40P (Ayora, *et al.*, 2002), la proteína de unión al origen G38P (Missich, *et al.*, 1997), el cargador de helicasa G39P (Ayora, *et al.*, 2002), así como de otras dos proteínas de la bacteria que participan en la replicación de SPP1 purificadas en el laboratorio: la primasa de *B. subtilis* DnaG (Ayora, *et al.*, 1998), y la subunidad τ de la DNA PolIII (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2002).

Antes de empezar los ensayos de interacción, se comprobó que la proteína G36P, y la mutante $\Delta C21$, no precipitan proteínas con la que no interaccionan como por ejemplo BSA. En el control, la proteína G36P, o la variante G36P- $\Delta C21$ (2 μ g), se incubó con 2 μ g de BSA en un volumen de 40 μ l en tampón E que contiene 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 5% glicerol, y tras 15 min de incubación en hielo se añadieron 145 μ l de tampón de reacción suplementado con sulfato amónico a la concentración final de 1,8 M (que corresponde al 37% de saturación) y se incubó durante 5 minutos más. Se centrifugó 1 minuto a 14000 rpm a 4 °C y luego se lavó el precipitado con 20 μ l de tampón de reacción con sulfato amónico 1,8 M, y finalmente se cargó el precipitado en un gel de acrilamida SDS-PAGE del 15%. El mismo ensayo se llevó a cabo incubando 2 μ g de cada proteína sola y añadiendo sulfato amónico como descrito anteriormente.

En la **Figura 23** se muestra que las proteínas G36P y la variante G36P- $\Delta C21$ precipitan (carriles 2-4), pero no favorecen la precipitación de la proteína BSA (carril 1 y 3), puesto que no interaccionan con ésta. Además, se muestra que la proteína BSA apenas precipita en presencia de sulfato amónico 1,8 M (carril 5). En otro gel se comprobó que la proteína BSA se quedó en el sobrenadante (dato no mostrado).

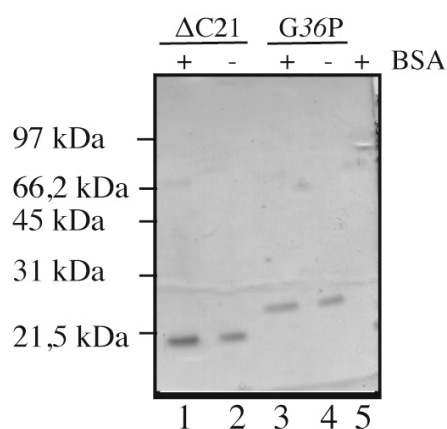


Figura 23. Control de ensayos de precipitación. Gel SDS-PAGE del 15% teñido con azul brillante de Coomassie donde se muestran las proteínas precipitadas tras la adición de sulfato amónico 1,8 M. El + indica que las proteínas (2 μ g de cada variante) se preincubaron con 2 μ g de BSA en un volumen final de reacción de 40 μ l. En el carril 5 se muestra la precipitación de la proteína BSA sola.

Para asegurarse que las proteínas ensayadas no precipitan en presencia del 37% de saturación de sulfato amónico por la presencia de otra proteína (es decir, por aumento de la concentración total de proteínas), se incubaron 2 μ g de cada proteína con 2 μ g de BSA en un volumen de 40 μ l, y se realizó el experimento en las condiciones anteriormente descritas. En ningún caso se detectó un aumento de concentración de proteína precipitada en presencia de BSA (dato no mostrado).

Una vez realizados todos los controles se procedió a determinar la interacción de G36P con las proteínas del replisoma de SPP1.

La proteína helicasa G40P de *Bacillus subtilis* es homóloga a la DnaB helicasa bacteriana, con una identidad de secuencia del 35% y del 45% con la helicasa replicativa de *E. coli* y la de *B. subtilis*, respectivamente. Se sabe que G40P interacciona a través de dominio N-terminal con la DnaG primasa de *B. subtilis* (Ayora, *et al.*, 1998, Wang, *et al.*, 2008). En *E. coli* se demostró que el complejo homólogo DnaB/primasa recluta la primasa a la horquilla de replicación, y ayuda PolIII a coordinar la síntesis de la cadena líder y de la atrasada, regulando la síntesis de los fragmentos de Okazaki (Zechner, *et al.*, 1992, Tougu, *et al.*, 1994, Lu, *et al.*, 1996). En *E. coli* no se ha detectado una interacción entre DnaB y SSB, pero se sabe que la primasa interacciona con SSB, aunque no se han identificado todavía los dominios de interacción (Yuzhakov, *et al.*, 1999).

Para corroborar si existe una interacción entre estas proteínas, se incubaron 2 μ g G36P con 2 μ g de G40P, en hielo durante 15 min en 40 μ l de tampón E. Luego se añadieron 145 μ l de tampón de reacción suplementado con sulfato amónico (concentración final 1,8 M) y tras 5 minutos de incubación se centrifugó durante un minuto a 14000 rpm. Los precipitados se lavaron con 20 μ l de tampón E con 1,8 M de sulfato amónico y se

volvieron a centrifugar. Finalmente los precipitados se resuspendieron en tampón Cracking 1X y se cargaron en un gel de acrilamida SDS-PAGE 15%.

En tres ensayos independientes, se observó que en ausencia de G36P, el $18 \pm 19\%$ de la proteína G40P precipita sola (**Figura 24**, calle 3). Sin embargo, cuando incubamos previamente la proteína G40P con G36P el $69 \pm 17\%$ de G40P va al precipitado. Eso nos indicaría una posible interacción. Para averiguar si ésta es a través del dominio C-terminal de G36P se incubó la helicasa con el mutante G36P Δ C21. En tres ensayos independientes, el $72 \pm 9\%$ de la proteína G40P precipita si preincubada con el mutante (**Figura 24**, calle 4). El resultado nos indicaría que G36P y G40P no interaccionan mediante el dominio C-terminal.

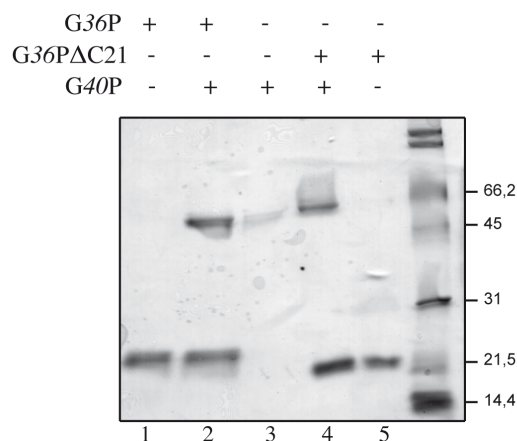


Figura 24. El dominio C-terminal de G36P no se requiere para la interacción con G40P. Gel SDS-PAGE del 15% teñido con azul brillante de Coomassie donde se muestran las proteínas precipitadas tras la adición de sulfato amónico 1,8 M. La proteína G40P apenas precipita (calle 3) al 37% de saturación de sulfato amónico, en cambio la proteína G36P y el mutante de delección Δ C21 aparecen en el precipitado (carriles 1 y 5 respectivamente). La proteína G40P precipita mayoritariamente si se preincuba con la proteína G36P o su variante (carriles 2 y 4).

Disponemos de G38P, proteína de unión al origen (Missich, *et al.*, 1997), y de la proteína G39P (Ayora, *et al.*, 1998), cargador de la helicasa, que junto a G40P forman el complejo de iniciación de la replicación de SPP1.

Para corroborar si G36P interacciona sólo con la helicasa, o también con otras proteínas encargadas del comienzo de la replicación y codificadas por el fago, se realizaron ensayos de precipitación al 37% de saturación de sulfato amónico de G38P y de G39P en presencia de las proteínas G36P y G36P- Δ C21. Se incubaron 2 μ g de G36P, o de su variante Δ C21, con 2 μ g de G38P (o G39P), en hielo durante 15 min en 40 μ l de tampón E. Luego se añadieron 145 μ l de tampón de reacción suplementado con sulfato amónico (concentración final 1,8 M) y tras 5 minutos de incubación se centrifugó durante un

minuto a 14000 rpm. Los precipitados se lavaron con el tampón E con 1,8 M de sulfato amónico y luego se cargaron en un gel de acrilamida SDS-PAGE 15%.

En tres ensayos independientes, se observó que el $22 \pm 5\%$ de la proteína G38P precipita sola, como se observa en el carril 5 de la **Figura 25**. El porcentaje de proteína en el precipitado aumenta hasta el $33 \pm 6\%$ cuando se preincuba G38P con G36P, y hasta el $26 \pm 7\%$ cuando se preincuba con su variante que ha perdido el dominio C-terminal (**Figura 25**, carriles 4 y 2, respectivamente). Este resultado indica que la proteína G36P podría interactuar débilmente con G38P a través del dominio C-terminal, aunque el experimento no es concluyente porque el porcentaje de proteína precipitado es pequeño.

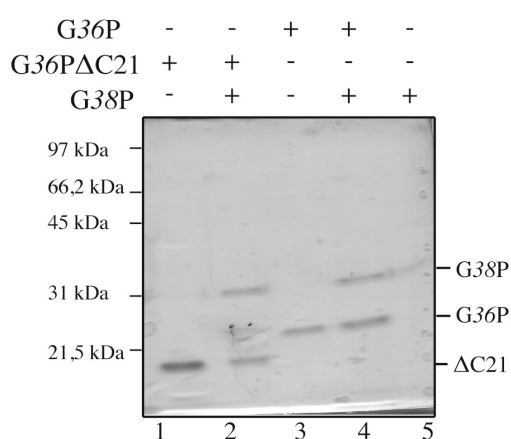


Figura 25. G36P podría interactuar débilmente con G38P a través del dominio C-terminal. Gel SDS-PAGE del 15% teñido con azul brillante de

Coomassie donde se muestran las proteínas precipitadas tras la adición de sulfato amónico (1,8 M final). Las proteínas (2 μ g de cada variante) se incubaron en 40 μ l de tampón E y tras 15 minutos, se añadieron 145 μ l de tampón E con sulfato amónico (concentración final 1,8 M). Se incubaron las muestras 5 minutos más y se centrifugó. Los precipitados se lavaron con 20 μ l de tampón E con 1,8 M final de sulfato amónico y se cargaron en el gel. En las calles 1, 3 y 5 se muestran, respectivamente, la precipitación de la proteína G36P, de la variante Δ C21, y de la proteína G38P, solas. En la calle 2 y 4, respectivamente, la precipitación de la proteína G38P preincubada con Δ C21, o con G36P.

G36P no parece interactuar con G39P. En dos ensayos independientes, el $27 \pm 4\%$ de la proteína G39P precipita sola en presencia de sulfato amónico (**Figura 26**, carril 2) y en presencia de G36P (**Figura 26**, carril 3) no se observa un considerable aumento de la cantidad de proteína precipitada ($29 \pm 8\%$).

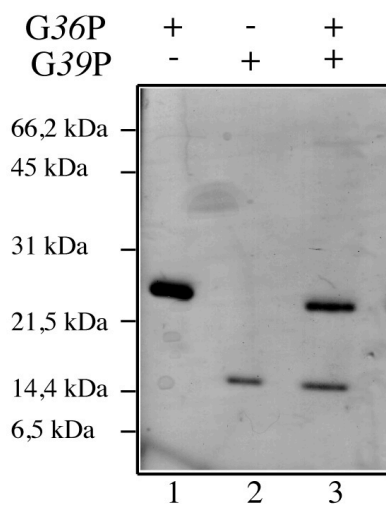


Figura 26. G36P y G39P no interaccionan *in vitro*. Gel SDS-PAGE del 15% teñido con azul brillante de Coomassie donde se muestran las proteínas precipitadas tras la adición de sulfato amónico 1,8 M. 2 μ g de G39P, o 2 μ g de G36P, o bien las dos proteínas juntas, se incubaron en 40 μ l de tampón E y tras 15 minutos de incubación en hielo, se añadieron 145 μ l de tampón E el sulfato amónico (concentración final 1,8 M). Se incubaron las muestras 5 minutos más y se centrifugó. Los precipitados se lavaron con 20 μ l de tampón E con 1,8 M final de sulfato amónico y se cargaron en el gel. En las calles 1 y 2 se muestran, respectivamente, la precipitación de la proteína G36P y de la proteína G39P, solas. En la calle 3 la precipitación de la proteína G39P preincubada con G36P.

Sucesivamente, se averiguó la interacción entre G36P y la primasa DnaG, utilizando el mismo protocolo. Se incubaron 2 μ g de la proteína G36P, o de su variante Δ C21, con 2 μ g de DnaG, en 40 μ l de tampón E durante 15 min en hielo y posteriormente se añadieron 145 μ l de tampón E con sulfato amónico (concentración final de 1,8 M). Incubamos 5 minutos en hielo y centrifugamos 1 min a 14000 rpm. Los precipitados se lavaron con 20 μ l de tampón E con 1,8 M final de sulfato amónico y se corrieron en un gel de acrilamida del 12,5%.

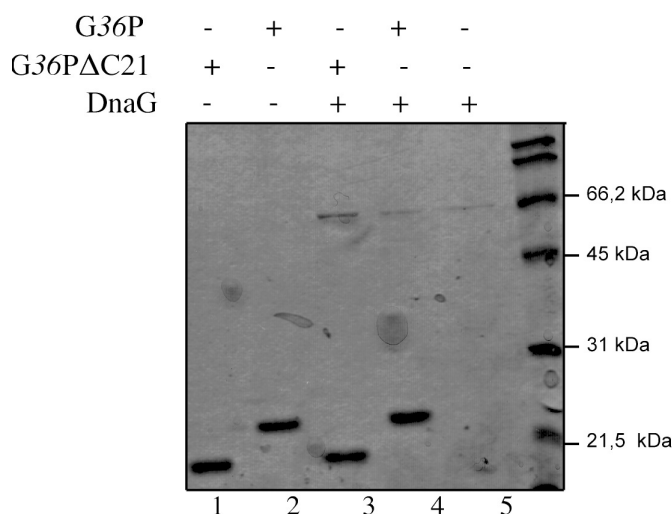


Figura 27. G36P no interacciona con DnaG. Gel SDS-PAGE del 12,5% teñido con azul brillante de Coomassie donde se muestran las proteínas precipitadas tras la adición de sulfato amónico 1,8 M. Las proteínas (2 µg de cada variante) se incubaron en 40 µl de tampón E y tras 15 minutos, se añadieron 145 µl de tampón E con sulfato amónico (concentración final 1,8 M). Se incubaron las muestras 5 minutos más y se centrifugó. Los precipitados se lavaron con 20 µl de tampón E con 1,8 M final de sulfato amónico y se cargaron en el gel. En las calles 1, 2 y 5 se muestran, respectivamente, la precipitación de la proteína Δ C21, de la proteína silvestre G36P, y de la proteína DnaG, solas. En la calle 3 y 4, respectivamente, la precipitación de la proteína DnaG preincubada con Δ C21, o con G36P.

En dos ensayos independientes se observa que el $3,5 \pm 0,6\%$ de DnaG precipita sola en presencia de sulfato amónico (**Figura 27**, calle 5). Si se pre-incuba con la proteína G36P, aparece en el precipitado un $5,7 \pm 2\%$ de DnaG (**Figura 27**, calle 4). Cuando se pre-incuba con el mutante de delección precipita el $7,3 \pm 1\%$ de DnaG. Este resultado indicaría que la proteína G36P no interacciona con la primasa DnaG.

En *E. coli* la proteína SSB interacciona a través del dominio C-terminal con la subunidad χ del cargador del factor de procesividad, o complejo DnaX, formado por las subunidades $\tau\gamma\delta\delta'\chi\psi$ (Witte, *et al.*, 2003); en *B. subtilis* parece que el complejo DnaX está formado únicamente por las proteínas $\tau\delta\delta'$ (Bruck & O'Donnell, 2000). Por lo tanto, se quiso averiguar si la proteína G36P interacciona con la subunidad τ del cargador del factor de procesividad de la PolIII de *B. subtilis*. Disponemos de la subunidad τ de la DNA polimerasa III de *B. subtilis*. Se demostró anteriormente que la helicasa G40P interacciona con esta subunidad favoreciendo el cargado de la DNA PolIII en el primosoma (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2002).

Se incubaron 2 µg de G36P con 2 µg de τ , en hielo durante 15 min en 40 µl tampón E. Luego se añadieron 145 µl de tampón E con sulfato amónico (concentración final 1,8 M) y tras 5 minutos de incubación se centrifugó durante un minuto a 14000 rpm. Los precipitados se lavaron con 20 µl de tampón E con 1,8 M de sulfato amónico y luego se cargaron en un gel de acrilamida SDS-PAGE 15%. En la **Figura 28** se observa que la proteína τ precipita sólo si está preincubada con G36P o con la variante $\Delta C21$. En dos ensayos independiente, se estimó que el $7 \pm 9 \%$ de proteína τ precipita sola, el $45 \pm 30 \%$, cuando se preincuba con G36P y el $68,5 \pm 24\%$ cuando se preincuba con $\Delta C21$. La interacción entre G36P y la subunidad τ de la DNA PolIII no está mediada por el dominio C-terminal de la proteína de unión a cadena sencilla.

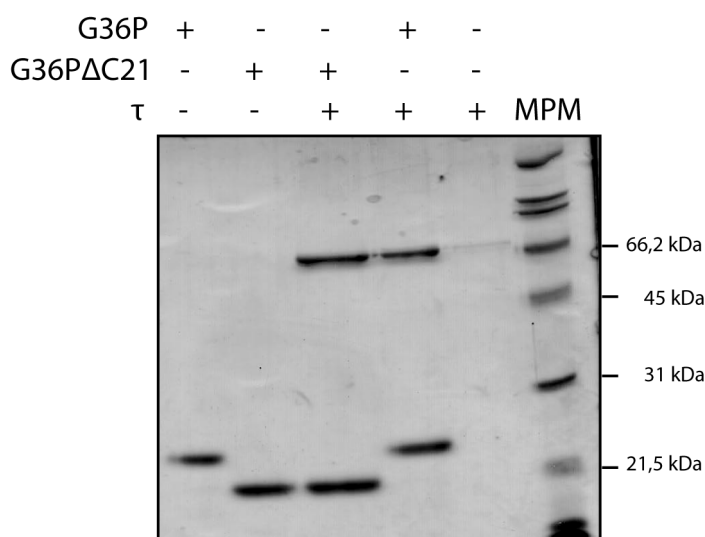


Figura 28. G36P interacciona con τ *in vitro*. Gel SDS-PAGE del 15% teñido con azul brillante de Coomassie donde se muestran las proteínas precipitadas tras la adición de sulfato amónico 1,8 M. La proteína τ no precipita (línea 5), en cambio la proteína G36P y el mutante de delección $\Delta C21$ aparecen en el precipitado (líneas 1 y 2 respectivamente). La proteína τ precipita si es preincubada con la proteína G36P (línea 4), o con la variante $\Delta C21$ (líneas 3).

Finalmente, de estos experimentos se concluyó que la proteína G36P interacciona físicamente con la helicasa replicativa G40P, codificada por el bacteriófago SPP1, y con la proteína τ codificada por *B. subtilis*. G36P parece establecer una fuerte interacción con las proteínas G40P y τ , mientras la interacción observada con la proteína organizadora del replisoma G38P resultó más débil. Además, los resultados parecen indicar que los últimos

21 aminoácidos del dominio C-terminal de G36P sólo son responsables de la interacción entre G36P y G38P.

Para corroborar bioquímicamente este resultado, en colaboración con la Doctora Elena Seco (este laboratorio), y con el grupo del profesor McHenry (Universidad de Colorado) se averiguó en un sistema de replicación *in vitro* si las deleciones de G36P en el dominio C-terminal no afectan a la replicación de SPP1.

El grupo del prof. Mc Henry reconstituyó el replisoma de *B. subtilis*, demostrando que la replicación *in vitro* requiere 13 proteínas (Sanders, *et al.*, 2010). Entre estas proteínas se encuentran la helicasa DnaC; el cargador de helicasa DnaI; las proteínas primosomales PriA, DnaB y DnaD, que son también cargadores de helicasa; las polimerasas Pol C, y DnaE que intervienen en la síntesis de la hebra adelantada y de la hebra retrasada. Además se requiere el factor de procesividad β , y la subunidades δ , δ' y τ , que constituyen el cargador del factor de procesividad; por último, se requiere la proteína de unión a cadena sencilla SsbA y la primasa DnaG.

En este laboratorio se ha reconstituido el replisoma de SPP1 *in vitro*, y se demostró que la helicasa DnaC, y los cargadores PriA, DnaI, DnaB y DnaD se podían sustituir por las proteínas del fago (G38P, G39P y G40P). Además, se observó que sustituyendo la proteína SsbA de *B. subtilis* por G36P, la horquilla de replicación era capaz de reconstituirse y progresar (Seco, *et al.*, 2013).

Se quiso averiguar en el sistema de replicación *in vitro* si las proteínas mutantes de G36P afectan la replicación. Para ello, se utilizó un DNA circular de cadena doble de 409 pb que lleva una cola de cadena sencilla de 396 nt en el extremo 5'. Este molde se caracteriza por tener en una de las cadenas una proporción de citosinas respecto a guaninas de 50:1 y, de este modo, en la otra cadena esta proporción es inversa de 50:1 para guaninas respecto a citosinas. En el ensayo se utilizan dCTP y dGTP marcados con ^{32}P en posición α , que se incorporan casi exclusivamente en la hebra adelantada y en la hebra retrasada, respectivamente. Este tipo de sustrato permite una replicación en círculo rodante y la formación de concatémeros donde el molde de DNA va a estar repetido en tándem (Sanders, *et al.*, 2010). Se incubó el molde (5 nM) con las proteínas G38P 300 nM (en monómero), G39P 180 nM (en dímero), 30 nM G40P (en hexámero) de SPP1, y con las proteínas de *B. subtilis* Pol C (20 nM en monómero), DnaE (15 nM en monómero), DnaG (8 nM monómero) y con las subunidades 24 nM β_2 , 25 nM δ , 25 nM δ' y 25 nM τ_4 , y se sustituyó G36P con cada uno de los mutantes de deleción. Al comparar en la **Figura 29** la síntesis de DNA de ambas hebras, la adelantada y la retrasada, se encontró que la síntesis de DNA está muy afectada cuando el ensayo se lleva

a cabo en presencia de estos mutantes, tanto a bajas (30 nM carriles 2-5), como a altas concentraciones (270 nM carriles 6-9). Los niveles de síntesis de DNA son incluso inferiores a los obtenidos en ausencia de G36P (en 1), lo que viene a decir que el extremo carboxilo de G36P se necesita para la replicación de DNA de SPP1.

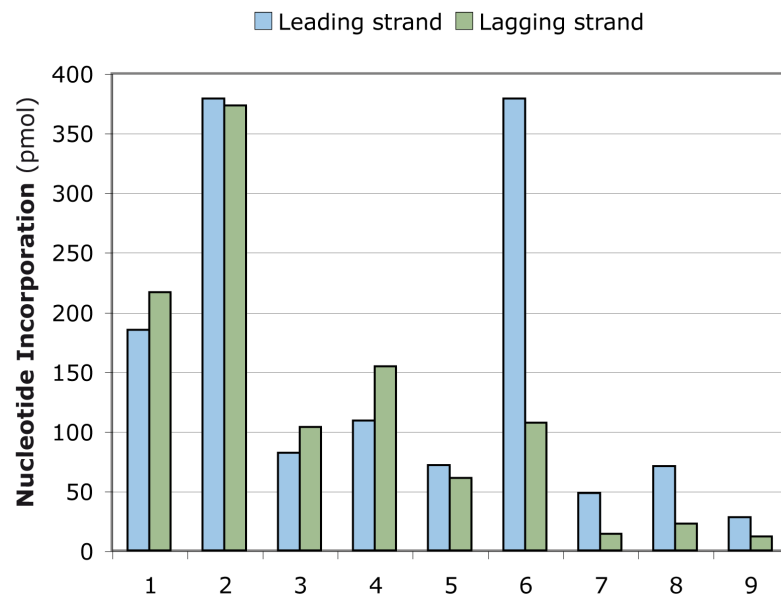


Figura 29. El dominio C-terminal de G36P se requiere en la replicación *in vitro* establecida con proteínas purificadas de SPP1 y proteínas de su hospedador. En 1, se cuantifica la síntesis de DNA en la hebra líder (en azul) y en la retrasada (en verde) en ausencia de G36P. En 2, 3, 4 y 5, se cuantifica la síntesis de DNA en presencia 30 nM (en tetrámero) de G36P, G36P-ΔC9, G36P-ΔC15 y G36P-ΔC21, respectivamente. En 6, 7, 8 y 9 se cuantifica la síntesis de DNA en presencia 270 nM (en tetrámero) de G36P, G36P-ΔC9, G36P-ΔC15 y G36P-ΔC21, respectivamente.

4.2.6 Interacción entre la proteína G36P y las proteínas de recombinación del fago: G34.1P, G44P y G35P

En algunos virus la proteína de unión a cadena sencilla actúa también como recombinasa. Es el caso de herpes simplex virus tipo I (HSV-I), donde la proteína de unión a cadena sencilla ICP8 cataliza el anillamiento de cadena homólogas e intercambio de cadenas (Bortner, *et al.*, 1993). ICP8 además, interacciona con UL12 (Thomas, *et al.*, 1992), la exonucleasa alcalina 5'-3' codificada por el mismo herpes virus y como G35P sobre G34.1P en SPP1 (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2005), inhibe la actividad exonucleasa sobre

DNA de cadena sencilla y estimula la digestión de DNAd para favorecer el intercambio de cadenas (Reuven, *et al.*, 2003).

En SPP1, no se ha detectado una interacción física entre G34.*IP* y G35P, pero se sabe que existe una coordinación entre la actividad de estas dos proteínas que resulta en el anillamiento de cadenas homólogas (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2005). Además, se ha descrito que la proteína G35P interacciona con G36P (Ayora, *et al.*, 2002). Por lo tanto, creemos que G34.*IP*, G35P y G36P actúan conjuntamente. Por ello, se intentó analizar la posible interacción de G34.*IP* y G35P con G36P.

Se incubaron durante 15 minutos en hielo 2 μ g de la proteína G34.*IP* sola, y 2 μ g de G34.*IP* con 2 μ g de G36P en 40 μ l de tampón E, y luego se añadieron 145 μ l de tampón E con sulfato de amonio (concentración final 1,8 M). Cinco minutos después, se centrifugo durante 1 minuto a 14000 rpm y se lavó el precipitado con 20 μ l tampón E con 1,8 M de sulfato amónico. El precipitado se resuspendió en tampón Cracking 1X y se corrió en un gel de 15%. En tres ensayo independientes, el $76 \pm 20\%$ de la proteína G34.*IP* precipita en presencia de sulfato amónico 1,8 M (**Figura 30**, carril 2). Cuando se preincuba con G36P precipita el $83 \pm 19\%$ de la proteína (**Figura 30**, carril 1). Puesto que más de la mitad de G34.*IP* precipita sola, la técnica de precipitación no es apropiada para el estudio de la interacción con G36P.

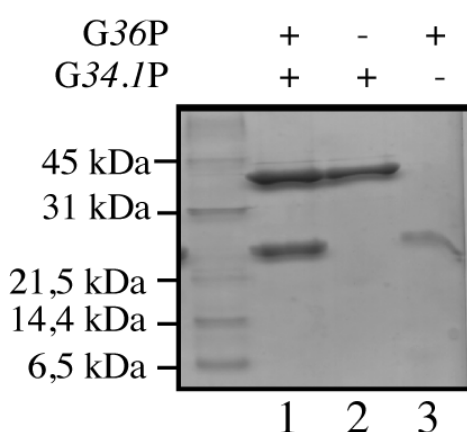


Figura 30. G34.*IP* precipita sola al 37% de saturación de sulfato amónico. Gel

SDS-PAGE del 15% teñido con azul brillante de Coomassie donde se muestran las proteínas precipitadas tras la adición de sulfato amónico 1,8 M. 2 μ g de G34.*IP*, o 2 μ g de G36P, o bien las dos proteínas juntas, se incubaron en hielo en 40 μ l de tampón E y tras 15 minutos se añadieron 145 μ l de tampón E con sulfato amónico (concentración final 1,8 M). Se incubaron las muestras 5 minutos más y se centrifugó. Los precipitados se lavaron con 20 μ l de tampón E con 1,8 M final de sulfato amónico y se cargaron en el gel. En las calles 2 y 3 se muestran, respectivamente, la precipitación de la proteína G34.*IP* y de la proteína silvestre G36P. En la calle 1 la precipitación de la proteína G34.*IP* preincubada con G36P.

En cambio, como la proteína G35P a 1,8 M de sulfato amónico se mantiene soluble, se ensayó su interacción con G36P por precipitación a esta concentración. Se incubó 2 μ g de la proteína G36P (o sus variantes) con la proteína G35P (2 μ g) en 40 μ l de tampón E. A

los 15 min de incubación en hielo se añadieron 145 µl de tampón E con sulfato amónico (1,8 M final) y 5 minutos después se centrifugó, durante 1 minuto a 14000 rpm. Se lavaron los precipitados con 20 µl de tampón E con 1,8 M de sulfato amónico, y se corrieron los precipitados en un gel de acrilamida del 15%. En la **Figura 31** (en el gel en A y en la cuantificación en B), se observa que G35P precipita 3,5 veces más si preincubada con G36P. En tres ensayos independientes, el $87 \pm 10\%$ de la proteína G35P queda en el sobrenadante tras la adición de sulfato amónico y el $13 \pm 10\%$ de la cantidad relativa de proteína precipita. Sin embargo, si incubamos juntas las dos proteínas G35P y G36P observamos que el $44 \pm 18\%$ de la proteína G35P precipita. El resultado indica que la proteína G35P interacciona con la proteína G36P, como se había mostrado anteriormente por columnas de afinidad (Ayora, *et al.*, 2002).

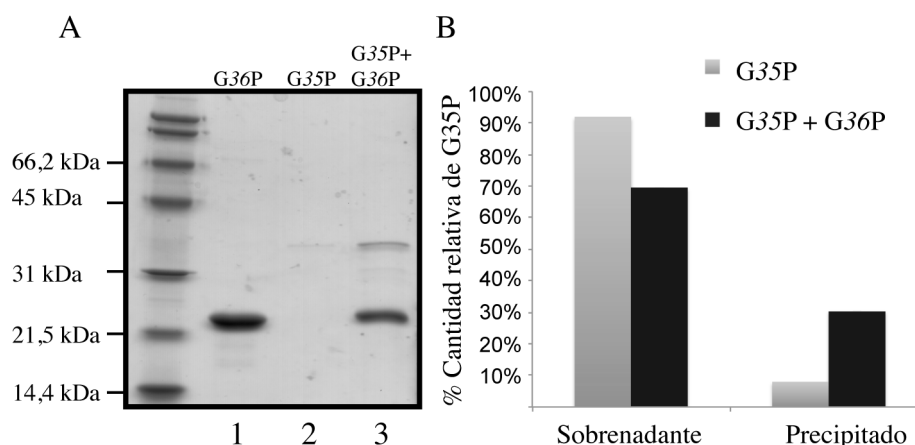


Figura 31. G36P y G35P coprecipitan en presencia de 1,8 M de sulfato amónico. En A, gel SDS-PAGE del 15% teñido con azul brillante de Coomassie donde se muestran las proteínas precipitadas tras la adición de sulfato amónico 1,8 M. 2 µg de G35P, o 2 µg de G36P, o bien las dos proteínas juntas, se incubaron en 40 µl de tampón E, y tras 15 minutos, se añadieron 145 µl de tampón E con sulfato amónico (concentración final 1,8 M). Se incubaron las muestras 5 minutos más y se centrifugó. Los precipitados se lavaron con 20 µl de tampón E con 1,8 M final de sulfato amónico y se cargaron en el gel. En las calles 1 y 2 se muestran, respectivamente, la precipitación de la proteína G36P y de la proteína G35P, solas. En la calle 3 la precipitación de la proteína G35P preincubada con G36P. En B. Cuantificación por Quantity One de la cantidad relativa de G35P en el sobrenadante y en el precipitado. En gris, G35P sola, en negro G35P preincubada con G36P.

Se repitió el ensayo, en las mismas condiciones, para comprobar si los mutantes de delección de G36P seguían manteniendo la interacción con G35P. En dos ensayos independientes se observó que cuando se incubaba previamente G35P con el mutante $\Delta C9$, precipita aproximadamente el $18\% \pm 10\%$ de la cantidad relativa de G35P, el $26\% \pm 14\%$

con $\Delta C15$ y el $33\% \pm 6,3\%$ en presencia de $\Delta C21$ (**Figura 32**). El resultado nos indica que la proteína G35P sigue interaccionando con el mutante $\Delta C21$, con lo cual los últimos 21 aminoácidos del dominio C-terminal de G36P no serían responsables de la interacción con la proteína G35P.

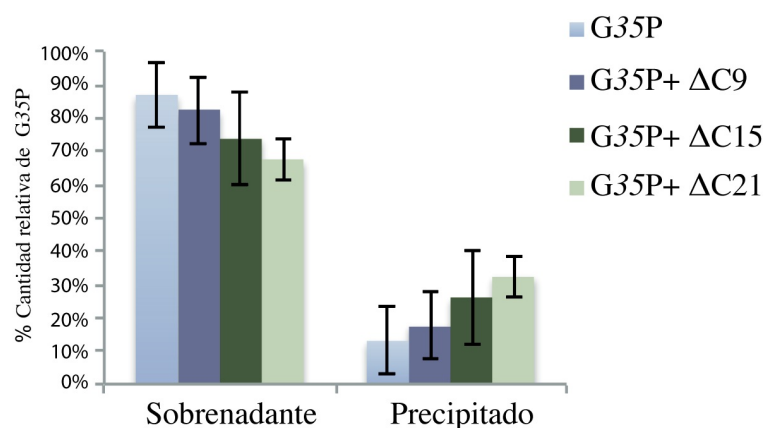


Figura 32. Los mutantes de delección de G36P interaccionan con G35P. Cuantificación en dos ensayos independientes de la cantidad relativa de G35P respecto a la concentración inicial de 2 μg en la precipitación con sulfato amónico (37%), en ausencia (en azul claro) y en presencia de 2 μg de las variantes $\Delta C9$, $\Delta C15$, y $\Delta C21$ de G36P (en morado, verde oscuro y verde claro, respectivamente) en un volumen final de tampón E de 185 μl .

Finalmente se decidió analizar si G36P interacciona con G44P, la resolvasa de estructuras de Holliday de SPP1 (Zecchi, *et al.*, 2012). Incubando 2 μg de la proteína G44P con la proteína G36P (2 μg) en 40 μl de tampón E en hielo durante 15 minutos, y tras la precipitación con sulfato amónico (1,8 M final) en tres ensayos independientes, se observó que en presencia de G36P la cantidad relativa de proteína G44P precipitada ($20,3\% \pm 8,3\%$) incrementa de ≈ 4 veces frente a la cantidad de proteína G44P que precipita sola en presencia de sulfato amónico ($5,9\% \pm 4,5\%$). Este resultado podría indicar que G36P y G44P interaccionan.

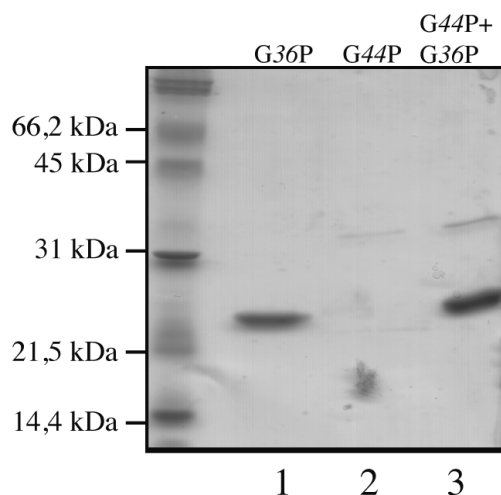


Figura 33. G36P y G44P interaccionan *in vitro*. En A gel SDS-PAGE del 15% teñidos con azul brillante de Coomassie donde se muestran las proteínas precipitadas tras la adición de sulfato amónico 1,8 M. 2 µg de G44P, o 2 µg de G36P, o bien las dos proteínas juntas se incubaron en tampón E (volumen 40 µl) y tras 15 minutos de incubación, se añadieron 145 µl de tampón E con sulfato amónico 1,8 M final. Se incubaron las muestras 5 minutos más y se centrifugó. Los precipitados se lavaron con 20 µl de tampón E con 1,8 M final de sulfato amónico y se cargaron en el gel. En las calles 1 y 2 se muestran, respectivamente, la precipitación de la proteína G36P y de la proteína G44P, solas. En la calle 3 la precipitación de la proteína G44P preincubada con G36P.

4.2.7 Construcción y purificación de los mutantes puntuales de G35P

Los resultados mostrados anteriormente demuestran que la proteína G35P se requiere para la replicación dependiente de recombinación (**Figuras 13 y 14**). *In vitro*, la proteína G35P es capaz de unir tanto DNAs como DNAd, aunque muestra preferencia por el primer sustrato. Además cataliza el intercambio de cadena y el anillamiento de DNAs de cadena sencilla homólogos (Ayora, *et al.*, 2002). Se desconocen los dominios de la proteína encargados de cada una de estas actividades, ya que no se ha podido obtener la estructura de rayos X (M. Martinez Jimenez y Fred Aston, comunicación personal) ni de otras proteínas de esta familia. Para determinar posibles dominios de esta proteína se hizo un anillamiento de secuencia con otras proteínas de la misma familia y se identificaron varios aminoácidos conservados de los que se seleccionaron 4: S76, R127, K224, E248 (**Figura 34**). Utilizando el plásmido pCB565, derivado del plásmido pHP13 que lleva clonado el gen 35, se realizó mutagénesis dirigida al fin de sustituir estos aminoácidos por alanina. Los plásmidos obtenidos se secuenciaron para verificar la secuencia de la región codificante.

```

G35P [SPP1] - MATKKQEELKNA LAQQNGAVPQT PVK PQD - - KVKGYLER - - MPAIKDVL PKHL DADR
Pmu_RecT - MAAPAKATDQKELGKALANKAAASNGOGK - - TIAQLFDE - - MKPAIAQAIPKHLTPER
Bce_RecT - MATN - - EKVKNLAGRKASAPVTPEQ - - - - - TVEAYMKK - - MAPRFAEVL PKHMSMDR
Eco_RecT - MATN - - EKIKNLANKRVNAPLSPEQ - - - - - TVEAYMKK - - MAPRFAEVL PKHMDMDR
Bcy_RecT - MTQA - - EKLRNQLTAKANGNSQA AKKQDGGKVTVADLLQQ - - MKPELERAL PKHL DADR
Bvi_RecT - MQMTKQPP IAKADLQKTCGRAPAAVKNSD - - - - - VISFINQPSMKEQLAALPRHMTAER

G35P [SPP1] LSRIAMNVIRTNPKLLECDTASLMGAVLES AKLGVEPG - LLGOAYILPYTNYKKKT V - -
Pmu_RecT LLRIATTSIRTNPKLVCTPESL LGAVMQCAQLGLEPS - LLGHAYLVPYRNKKKDAAGKD
Bce_RecT MSRIALT TIRTNPKLLECKVPSLMGAVMQAVQLGLEPG - LLGHICYILPYKS - - - - -
Eco_RecT MSRIALT TIRTNPKLLECNVPSLMGAVMQAVQLGLEPG - LLGHICYILPYKG - - - - -
Bcy_RecT LIRIAMTEMRRNP ELLSCEIKSL LGATMQAAQLGLEPG - LLGHICYILPFKNRKNKGT - -
Bvi_RecT MIRIATTEIRKVPALGNCDTMSFVSAIVQCSQLGLEPGSALGHAYLPLFGNKNKESGKK -

G35P [SPP1] - - - - EAQF ILGYKGLIDLVRSSGHVSTISAQTVYKNDTFEYEGLDLKVHRPAPFGTD
Pmu_RecT LGWVDEAQFQIGYKGYIELARRTGHVSSIVAQAVHEKDLFEYEGIDEKL RHVPADG - - D
Bce_RecT - - - - EATFIIGYKGMIDLARRSGHTQS IYAHAVYENDEFEYELGLHPQLKHKP - SFG - D
Eco_RecT - - - - EATFIIGYKGMIDLARRSGHTQS IYAHAVYENDEFEYELGLNPQLKHKP - SFG - D
Bcy_RecT - - - - EVQFVIGYKGLIDLVRSSGEVETIKAEAVYENDEFEYGLDERLRHKPLLLFG - D
Bvi_RecT - - - - NVQL IIGYRGMIDLARRSGQIASLSARVVREGDEFSEFGLDEKLIHRPGEN - - E

G35P [SPP1] RGE PVGYAVAKMKDGGYNFLVMSKQDVEKH RDAFSKSKNREGVVYGPWADHFDAMAKKT
Pmu_RecT RGPVTKYYAYAKFKDGGYSFMVMSKRDI ELHRDKFSKAKT - - - - YGPWVDHFDAMAKKT
Bce_RecT RGEFI GAYAVAHFKDGGHOMEFMPKSEIEKRRGRSASANSN - - - YSPWKTDYEEMAKKT
Eco_RecT RGEFI GAYAVAHFKDGGHOMEFMPKSEIEKRRGRSASANSN - - - YSPWKSDYEEMAKKT
Bcy_RecT RGKLI GFYAYAKFKDGGHAFHVMVSEIEINRLRDKYSRAKE - - - SGPWREEYEAMAKKT
Bvi_RecT DAPVTHVYAVARLKDGGTQFEVMT RKQIELVR - SLKAGNN - - - GPWVTHWEEMAKKT

G35P [SPP1] VLRQLINYLPI SVEQLSGVAADERTGSELHNQFADDDNI INVDINTGEI IDHQEKLGGET
Pmu_RecT VLRKALMKYMPISVEFQKAVSMDET TKREVSDMS - - EVIDVTDWSEAQVEEAGEERDPDT
Bce_RecT VVRYMFKYLPISIEVQSQAHDEVRKDI TEPE - - - FLEADSIEVEQ - PTEGDG - QGDF
Eco_RecT VVRYMFKYLPISIEVQSQAHDEVRKDI TEPEQ - - - FLEADSIEVEETPTEGTN - QEEF
Bcy_RecT VIRQLIKYLPISIEIQRNISLDETVRKDI HDEPEQVDYIDMEVEAIEGEVIDGDS SEQET
Bvi_RecT AIRRLFKYLPVSI EIQRVSMDEKEPLTIDPADS - - - - SVLTGEYSVIDNS EE - - -

G35P [SPP1] - - - - - NE - - -
Pmu_RecT GFPTNSPPEDEVTFE
Bce_RecT VIEG - - - - -
Eco_RecT VIEE - - - - -
Bcy_RecT AAEEQQELFN - - - - -
Bvi_RecT - - - - -

```

Figura 34. Alineamiento de la proteína G35P con otras proteínas que pertenecen a la familia RecT (Boxshade). Se alineó la proteína G35P de SPP1 con las proteínas RecT de *Paenibacillus mucilaginosus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cytotoxicus* y *Bacillus virus*. En negro se muestran los aminoácidos idénticos, en gris los conservados. En rojo se evidencian los aminoácidos conservados que se han mutado en la proteína G35P.

Los genes mutantes fueron clonados en el vector lanzadera pHP13 para determinar si la mutación complementaba o no la función de G35P y los plásmidos resultantes se transformaron en células de *B. subtilis*. El ensayo de complementación se realizó utilizando el mutante termosensible en G35P (*tsI20F*). Este mutante a temperatura no

permissiva (50 °C) no puede amplificarse, a menos que se complemente la función de G35P *in trans*.

Se cultivaron las células de *B. subtilis* a 30 °C, que llevaban o bien un plásmido en el que se ha clonado el gen que codifica la proteína G35P (o sus variantes), o bien el plásmido pHP13 vacío, hasta alcanzar la fase exponencial. Al alcanzar la fase exponencial los cultivos se incubaron 30 minutos a 50 °C en agitación y se infectaron con el mutante *tsI20F* con una *moi* de 10; tras dos horas de infección (a 50 °C) se corroboró el título de fagos por recuento en placa. En la **Tabla 8** se indica el título obtenido en las distintas cepas. Los datos obtenidos indican que a temperatura no permissiva, mientras la cepa que contiene el gen silvestre de G35P complementa el defecto del mutante *tsI20F*, las cepas que contienen las mutaciones S76A, K224A y R127A, no complementan la ausencia de G35P. Por su parte, la cepa que contiene la variante E248A complementa aproximadamente un 27% el defecto del mutante *tsI20F*. Por lo tanto, mientras los aminoácidos S76, K224 y R127 parecen esenciales para la actividad de la proteína G35P, la ausencia del aminoácido E248 parece producir sólo una atenuación de la función.

Plásmido	Título (fagos/ml) tras infección a 50°C
pCB565 (G35P <i>wt</i>)	2,6 X 10 ⁷
pCB780 (R127A)	< 10 ⁴
pCB781 (E248A)	0,7 X 10 ⁷
pCB782 (K224A)	< 10 ⁴
pCB783 (S76A)	< 10 ⁴
pHP13 (control -)	< 10 ⁴

Tabla 8. Complementación *in vivo* de los mutantes de G35P. Se cultivaron las células de *B. subtilis*, que llevaban, o bien el plásmido pCB565, que lleva la proteína G35P silvestre, o bien los plásmidos pCB780, pCB781, pCB782, pCB783, que llevan respectivamente las mutaciones R127A, E248A, K224A y S76A de la proteína G35P. Alcanzada la fase exponencial, se incubaron las células a 50 °C durante 30 minutos y luego se infectaron con el mutante *tsI20F* (*moi* de 10); tras dos horas de infección se corroboró el título de fagos por recuento en placa. El plásmido pHP13 vacío, se utilizó como control negativo.

Sucesivamente, se clonaron los genes mutados en el vector de sobreexpresión pET3a y se sobreexpresaron las proteínas en *E. coli*. Para mejorar la solubilidad de estas proteínas, se desarrolló un protocolo de sobreexpresión a baja temperatura (18 °C) y con mínimas

concentraciones de IPTG (0,2 mM). Además, como se ha descrito en materiales y métodos, se desarrolló un nuevo protocolo de purificación de G35P. La proteína silvestre y los distintos mutantes se purificaron con el mismo procedimiento, sin embargo, la variante E248A se reveló menos soluble respecto al resto de las proteínas purificadas.

4.2.8 Unión a DNA de las variantes de G35P

La capacidad de las proteínas mutadas para unir DNA se midió por retraso en gel con un oligo de 114nt (0,4 nM) marcado radioactivamente en su extremo 5'. El DNA se incubó durante 15 min a 37°C con cantidades crecientes de G35P (o de sus variantes) en tampón D en presencia de 5 mM MgCl₂ o en presencia de 2,5 mM EDTA. A continuación las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 5% en tampón Tris 25 mM, glicina 250 mM pH 8 y corrieron a 180 V durante 90 min a temperatura ambiente. El gel se secó y se reveló por autorradiografía.

En la **Figura 35** se observa que cuando se incrementa la concentración de proteína, G35P forma varios complejos difusos, con diferente movilidad, independientemente de la presencia de magnesio o EDTA. Estos complejos podrían tratarse o de moléculas de G35P unidas a DNAs que interaccionan con otras G35P unidas a otra moléculas de DNA, o bien podrían tratarse de múltiples G35P unidas al DNA.

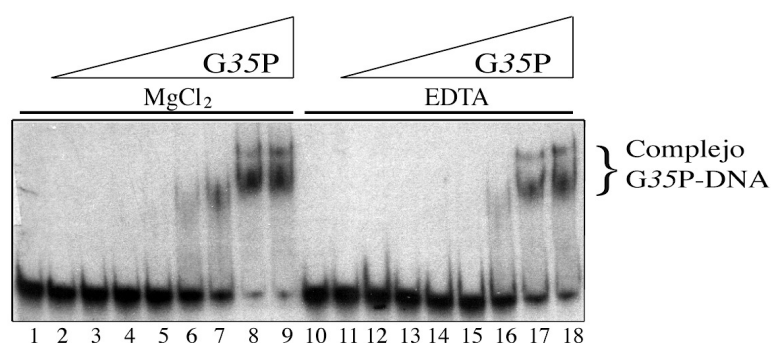


Figura 35. Unión a cadena sencilla de G35P. Desde el carril 2 al 9 y del carril 11 al 18 se incubaron respectivamente 0,8 nM, 1,7 nM, 3,5 nM, 7 nM, 15 nM, 30 nM, 60 nM, 120 nM, de la proteína G35P con el oligo A2 de 114 nt marcado radioactivamente en tampón D con 5 mM MgCl₂ (carriles 1-9) o en presencia de 2,5 mM EDTA (carriles 10-18) durante 15 minutos a 37°C. En la calle 1 y en la calle 10 no se añadió proteína. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 5% en tampón Tris 25 mM, glicina 250 mM pH 8. El gel corrió 90 minutos a 180 V, posteriormente se secó y se reveló por autorradiografía.

Analizando la interacción entre los mutantes de G35P y el DNA de cadena sencilla se observa que la variante K224A ha perdido su capacidad de unión a DNAs (Figura 36). A altas concentraciones de proteína (1 μ M) no se observa formación de complejos con el DNA. En cambio, en presencia de los mutantes S76A y R127A (Figura 36 parte B y C) se observa el mismo patrón de retraso dado por la proteína silvestre. Finalmente, en la parte D de la Figura 36 se observa que el mutante E248A, una DNA formando un único complejo. Subiendo la concentración de E248A no se observa un aumento del DNA retenido. Por lo tanto, es probable que la proteína no forme complejos estables, o bien que forme agregados puesto que durante la purificación se reveló menos soluble que las otras variantes.

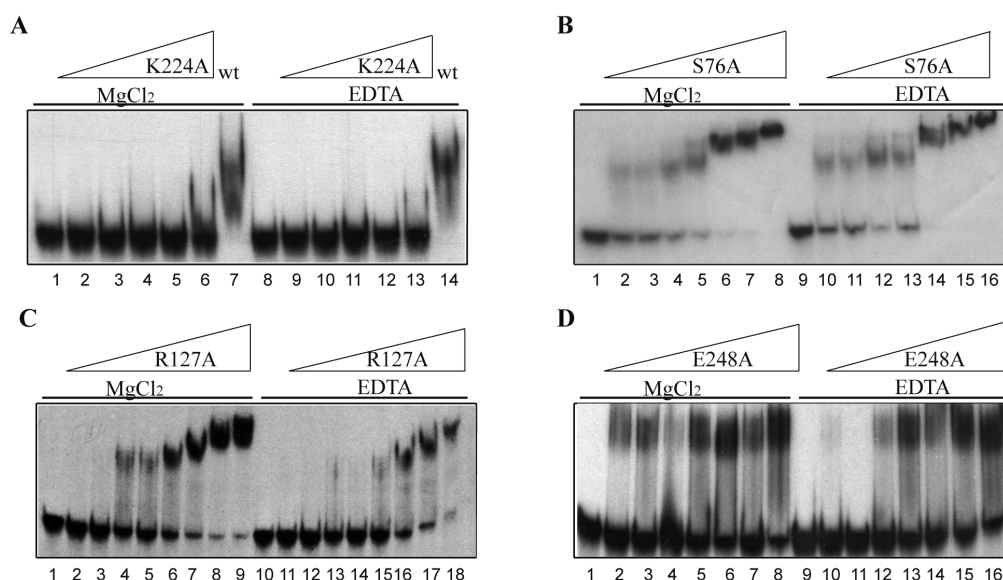


Figura 36. Unión a cadena sencilla de los mutantes de G35P. En **A**, desde el carril 2 al 6 y del carril 9 al 13 se incubaron respectivamente 60 nM, 120 nM, 250 nM, 500 nM y 1000 nM del mutante K224A con un oligo de 114nt. En la calle 1 y en la calle 9 no se añadió proteína y en las calles 7 y 4 se incubó el DNA con 250 nM de G35P silvestre. En **B**, desde el carril 2 al 8 y del carril 10 al 16 se incubaron respectivamente 15 nM, 30 nM, 60 nM, 125 nM, 250 nM and 500 nM del mutante S76A con el DNA. En la calle 1 y en la calle 9 no se añadió proteína. En **C**, desde el carril 2 al 9 y del 10 al 16 se incubaron respectivamente 3,5 nM, 7 nM, 15 nM, 30 nM, 60 nM, 125 nM, 250 nM y 500 nM del mutante R127A con el DNA. En la calle 1 y en la calle 10 no se añadió proteína. En **D**, desde el carril 2 al 8 y del carril 10 al 16 se incubaron respectivamente 1 nM, 2 nM, 3,8 nM, 7,5 nM, 15 nM, 30 nM, 60 nM del mutante E248A con el DNA. En la calle 1 y en la calle 9 no se añadió proteína. Desde el carril 10 al 16 se incubaron respectivamente 2 nM, 3,8 nM, 7,5 nM, 15 nM, 30 nM, 60nM y 125 nM del mutante E248A con el DNA.

En la **Tabla 9** se indican las constantes aparentes calculadas en presencia de $MgCl_2$ y en presencia de EDTA, utilizando el oligo A2 de 114 nt.

	G35P-wt	S76A	R127A	K224A	E248A
K_{app} 5 mM $MgCl_2$	$\cong 30$ nM	$\cong 45$ nM	$\cong 52$ nM	$>1\mu M$	$\cong 11,5$ nM
K_{app} 2,5 mM EDTA	$\cong 36$ nM	$\cong 26$ nM	$\cong 71$ nM	$>1\mu M$	$\cong 30$ nM

Tabla 9. K_{app} de la proteína G35P silvestre a DNA de cadena sencilla (114 nt) y de los mutantes puntuales en tampón D presencia de 5 mM $MgCl_2$ y 2,5 mM EDTA (media de tres ensayos independientes).

Se estudió si los mutantes de G35P conservaban la capacidad de unión a DNA de doble cadena. Para ello un sustrato de 416 pb obtenido por digestión con EcoRI y DraIII del plásmido pGEM3Z-f(+) se marcó radioactivamente utilizando α - ^{32}P -dATP y la enzima Klenow. El fragmento (3 nM) se incubó con concentraciones decrecientes de proteínas, en el tampón D con 2,5 mM EDTA durante 15 minutos a 37 °C. A continuación las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 6% en tampón TAE y se corrieron a 180 V durante 90 min a temperatura ambiente. El gel se secó y se reveló por autorradiografía. En la **Figura 37** se observa que la proteína silvestre une el DNA de cadena doble formando un único complejo que se retrasa en el gel (carril 2). Analizando los mutantes se observa que a las concentraciones probadas, el mutante K224A no une DNA de cadena doble (carril 11-14). Las mutaciones R127A y S76A también afectan la unión a DNAcd de la proteína G35P, ya que a las concentraciones probadas no unen el 50% del sustrato. Finalmente se observa que el mutante E248A une DNA de cadena doble con más afinidad que la proteína silvestre (**Figura 37**, carril 14).

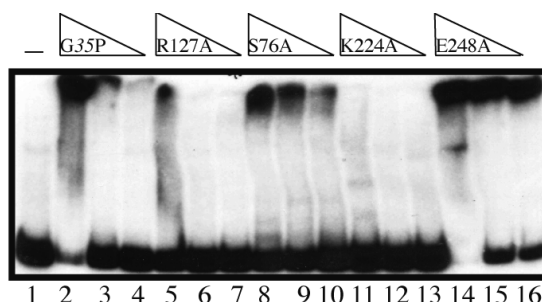


Figura 37. Unión a cadena doble de la proteína G35P y sus variantes. Se incubaron concentraciones decrecientes de proteína (250, 125 y 60 nM) con un DNA de cadena doble de 416 pb (3 nM) marcado radioactivamente en tampón D con 2,5 mM EDTA durante 15 minutos a 37°C. En la calle 1 no se añadió proteína.

En la **Tabla 10** se calcularon las K_{app} de la proteína silvestre G35P y de sus variantes, haciendo medias de los resultados obtenidos en dos ensayos independientes.

	G35P-wt	S76A	R127A	K224A	E248A
K_{app} 2,5 mM EDTA	$\cong 140$ nM	>250 nM	>250 nM	>250 nM	$\cong 100$ nM

Tabla 10. K_{app} de la proteína G35P silvestre a DNA de cadena doble (416 pb) y de los mutantes puntuales en tampón D presencia de 2,5 mM EDTA (media de dos ensayos independientes).

4.2.9 Las variantes de G35P catalizan la reacción de anillamiento

La proteína G35P une DNA de cadena sencilla, y en presencia de una hebra de DNA complementaria acelera la reacción de anillamiento. Para corroborar si las variantes de G35P siguen manteniendo esta capacidad, se incubaron en tampón 25 mM Tris HCl pH 7,5, 5 mM β -mercaptoetanol, 50 μ g/ml BSA, 50 mM NaCl, 2,5 mM $MgCl_2$, tres concentraciones de la proteína silvestre (12, 25 y 50 nM), o de los mutantes, con 0,5 nM de DNA de 416 pb (fragmento obtenido por digestión DraIII-EcoRI del plásmido pGEM3Z-f(+)) marcado radioactivamente. El sustrato se desanilló previamente por calor (100 °C), y se guardó unos minutos en hielo antes de añadirlo a la reacción. La reacción se incubó durante 15 minutos a 37 °C y sucesivamente se desproteinizó mediante la reincubación con proteinasa K 2,5 mg/ml, SDS 2% y EDTA 30 mM durante 20 min a 37 °C. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 5% en tampón Tris 25 mM, glicina 250 mM, pH 8, y la electroforesis corrió a 180V durante 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente se secó el gel y se reveló por autorradiografía.

En la **Figura 38** observamos que aproximadamente el 5% del DNA se anilla espontáneamente (calles 3, 6, 9). Sin embargo, cuando al sustrato se le añade la proteína G35P se observa un aumento de la proporción de DNA de doble cadena. Analizando los mutantes se observa que mientras los mutantes E248A y el S76A catalizan la reacción con la misma eficiencia que la proteína silvestre, el mutante R127A anilla el DNA en con menos eficiencia.

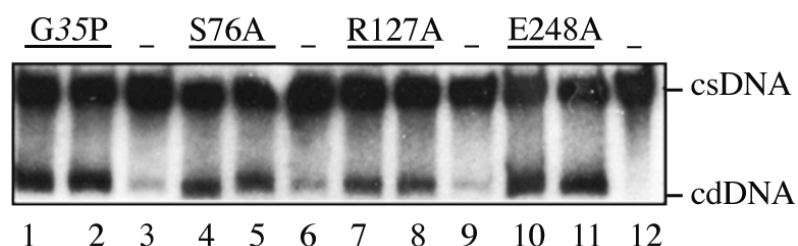


Figura 38. Reacción de anillamiento. Se calentó el DNAd de 416 pb marcado radioactivamente a 100 °C durante 5 min y se puso rápidamente en hielo (calle 12). El DNA (0,5 nM) se incubó con 100 nM o 200 nM de G35P (calle 1 y 2), G35P-S76A (calles 4 y 5), G35P-R127A (calles 7 y 8) o G35P-E248A (calles 10 y 11) durante 15 minutos a 37°C en tampón 25 mM Tris HCl pH 7,5, 5 mM β -mercaptoetanol, 50 μ g/ml BSA, 50 mM NaCl, 2,5 mM $MgCl_2$. En la calles 3, 6 y 9 se observa el anillamiento espontáneo tras 10 min de incubación a 37 °C en ausencia de proteínas. Las reacciones se pararon con un tampón de desproteinizante (proteínasa K 2,5 mg/ml, SDS 2% y EDTA 30 mM) y se corrieron en un gel de poliacrilamida del 5% con Tris-Glicina. El gel se secó y se reveló por autorradiografía.

4.2.10 Análisis de la interacción de G36P con las variantes de G35P

En el apartado anterior se ha observado por coprecipitación con sulfato amónico que la proteína G35P interacciona con la proteína G36P. Ahora se pretendía estudiar si los mutantes puntuales de G35P, que contienen cambios en aminoácidos conservados de la proteína, seguían interaccionando con G36P. Para ello, repetimos el ensayo de coprecipitación cambiando la proteína silvestre por cada uno de los mutantes. Incubamos 2 μ g de cada proteína con 2 μ g de G36P en 40 μ l de tampón E y tras 15 minutos de incubación en hielo, se añadió sulfato amónico al 37% de saturación (145 μ l de tampón E con sulfato amónico, concentración final 1,8 M). Tras 5 minutos de incubación, se centrifugó durante 1 minuto a 14000 rpm y se lavaron los precipitados con 20 μ l de tampón E con 1,8 M de sulfato amónico. A continuación se volvió a centrifugar. Los precipitados y los sobrenadantes se corrieron en un gel de acrilamida al 15%.

En tres ensayos independientes, se observó que la proteína que tiene mutado el aminoácido 76 precipita un $12\% \pm 1\%$ en presencia de sulfato amónico, y en presencia de la proteína G36P no aumenta su porcentaje de precipitación (**Figura 39 A**). El resultado nos indicaría que esta variante de G35P no interacciona con la proteína G36P y que la serina 76 estaría implicada en la interacción entre las dos proteínas.

En cambio, observamos que los mutantes K224A y R127A precipitan solos en presencia de sulfato amónico, respectivamente, un $8\% \pm 2\%$ (**Figura 39 B**), y un $17\% \pm 4\%$ (**Figura 39 C**). Cuando a las reacciones añadimos la proteína G36P, el porcentaje de precipitación aumenta hasta el $26\% \pm 12\%$ en el caso de K224A, y hasta el $35\% \pm 14\%$ en el caso del mutante R127A. Por lo tanto las proteínas mutadas E248A y R127A parece que interaccionan con la proteína G36P.

Finalmente, se observó que el mutante E248A interacciona con G36P (**Figura 39 en D**). En este caso, se encontró que el $45\% \pm 7\%$ de la proteína precipita sola en presencia de sulfato amónico, sin embargo añadiendo a la reacción G36P el $83\% \pm 10\%$ de la proteína va al precipitado.

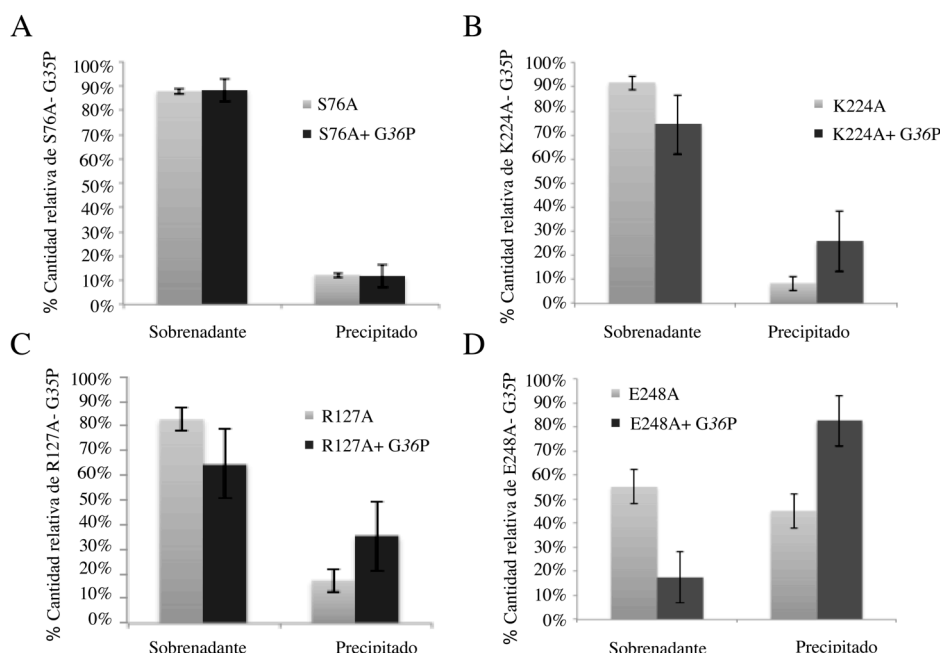


Figura 39. Cuantificación de la cantidad relativa de las variantes de G35P en la precipitación con sulfato amónico en presencia y en ausencia de G36P. Se incubaron 2 μg de cada variante en ausencia (en azul claro) y en presencia de 2 μg de la proteína G36P en 40 μl de tampón E durante 15 minutos en hielo. A continuación, se añadieron 145 μl de tampón E con 1,8 M de sulfato amónico (37% de saturación) y se incubaron las muestras 5 minutos más, luego se centrifugó. Los precipitados se lavaron con 20 μl de tampón E con 1,8 M final de sulfato amónico y se volvieron a centrifugar. Sobrenadantes y precipitados se cargaron en un gel de acrilamida del 15%. La intensidad de las bandas, de tres ensayos independientes por cada mutante, se cuantificó por Quantity One.

4.2.11 G36P facilita la unión de G35P a DNA de cadena sencilla

Se estudió la posible interacción entre G35P y G36P, sobre DNA de cadena sencilla. Para ello, se incubó el oligo A2 de 114 nt (0,4 nM) marcado radioactivamente con la proteína G35P (10 o 20 nM) durante 10 minutos a 37°C en tampón D con 2,5 mM MgCl₂. A continuación se añadieron concentraciones crecientes de G36P (de 0,1 hasta 0,9 nM) y se incubó la reacción durante 10 minutos a 37 °C. Luego, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 5% en tampón Tris 25 mM, glicina 250 mM pH 8 y corrieron a 180 V durante 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente se secó el gel y se reveló por autorradiografía.

En la **Figura 40** se observa que la proteína G35P a bajas concentraciones (10 y 20 nM) une el DNA con muy poca afinidad y forma un complejo difuso que migra con baja movilidad (carriles 2 y 7). En cambio, como se ha observado en experimentos anteriores (**Figura 20**), concentraciones crecientes de la proteína G36P forman dos complejos que llamamos I y II (calles 12 a 15), que probablemente coinciden con un tetrámero y dos tetrámeros de la proteína unidos respectivamente al DNA. Si preincubamos el DNA con la proteína G35P durante 10 min y después añadimos concentraciones crecientes de la proteína G36P e incubamos durante 10 minutos más a 37°C se observa que la proteína de unión a cadena sencilla facilita el cargado de G35P sobre el DNA (calles 3 a 6 y 8 a 11), formándose un nítido complejo G35P-DNA, que a la misma concentración de G35P sólo se intuía.

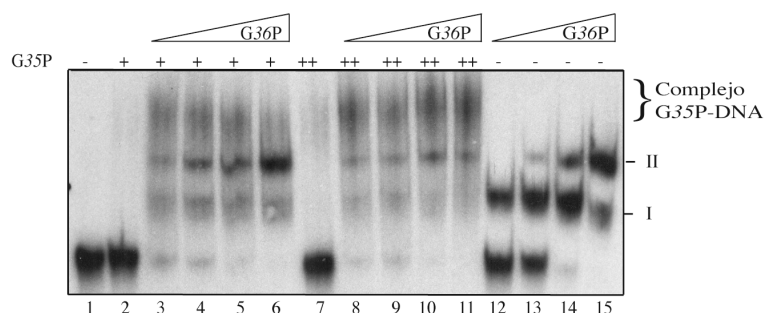


Figura 40. Unión de G36P y G35P a DNAs 114nt marcado radioactivamente. Se incubó el DNA (0,4 nM) con concentraciones crecientes de G36P (0,1, 0,2, 0,4, 0,9 nM) (calles 12-15) o con G35P (10 nM (+) en calle 2, 20 nM (++) en calle 7) durante 10 min a 37 °C en tampón D con 2,5 mM MgCl₂. La calle 1 no lleva proteína. En las calles de 3 a 6 y de 8 a 11 se incubó el oligo con G35P (10 nM o 20 nM respectivamente) durante 10 min a 37 °C y luego se añadieron concentraciones crecientes de G36P (0,1, 0,2, 0,4, 0,9 nM) y se incubó durante 10 minutos más a 37°C. Las reacciones se pararon con un tampón de carga y se separaron en un gel de poliacrilamida del 5% en tampón Tris-Glicina. G36P forma con el DNA dos complejos con diferente movilidad que se indican con I y II.

Se demostró anteriormente que la recombinasa G35P precipita en presencia de sulfato amónico al 37% de saturación si a la reacción se añade la variante Δ C21-G36P (**Figura 32**). Para confirmar la interacción entre G35P y la variante Δ C21-G36P se quiso corroborar si este mutante de delección también facilita la unión de G35P a DNA de cadena sencilla. Para ello, se incubó el oligo de 114 nt (0,4 nM) marcado radioactivamente con G35P, en las mismas condiciones anteriores, y tras 10 min de incubación se añadieron concentraciones crecientes del mutante de delección Δ C21 (de 0,1 nM hasta 0,9 nM) y se incubó durante 10 minutos a 37°C. Como se ha mostrado anteriormente (**Figura 21, B**) el mutante de G36P- Δ C21 forma sobre DNA de cadena sencilla dos tipos de complejos (I y II, carriles 14-18). En la **Figura 41**, se observa que, como la proteína silvestre (carriles 3-6), el mutante Δ C21 facilita el cargado de la proteína G35P sobre el sustrato de cadena sencilla (líneas 11-14), por lo tanto, desaparecen los nítidos complejos I y II a favor del complejo difuso originado por G35P unido al DNA.

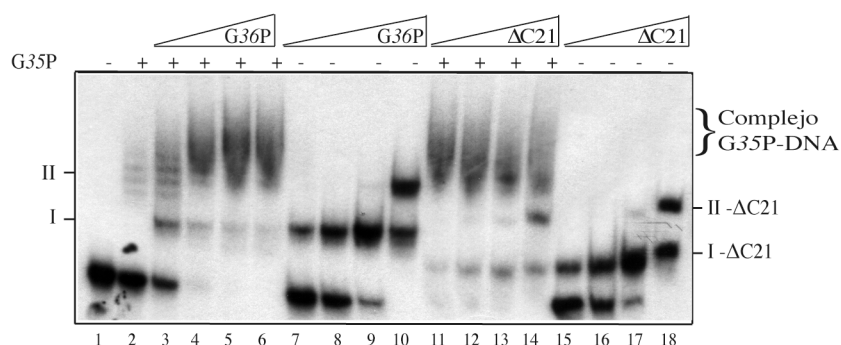


Figura 41. Unión de G36P- Δ C21 y G35P al DNAs. El oligonucleótido de 114 nt (0,4 nM) marcado radioactivamente se incubó con G35P (10 nM, calle 2) o con concentraciones crecientes de G36P (0,1, 0,2, 0,4, 0,9 nM) (calles 7-10) o G36P- Δ C21 (0,1, 0,2, 0,4, 0,9 nM) (calles 15-18) durante 10 min a 37 °C en tampón D con 2,5 mM $MgCl_2$. La calle 1 no lleva proteína. En las calles de 3 a 6 y de 11 a 14 se incubó el oligo con G35P (20 nM) durante 10 min a 37 °C, luego se añadieron concentraciones crecientes (0,1, 0,2, 0,4, 0,9 nM) de G36P o Δ C21 y se incubó la reacción 10 minutos más a 37 °C. Las reacciones se pararon con un tampón de carga y se separaron en un gel nativo de poliacrilamida del 5% en tampón Tris-Glicina. El mutante Δ C21 forma con el DNA dos complejos con diferente movilidad que se indican con I- Δ C21 y II- Δ C21.

4.2.12 Las proteínas G35P y G36P forman sobre el DNA de cadena sencilla complejos independientes

En el apartado anterior se observó que cuando se preincuba el DNA de cadena sencilla con la proteína -G35P y posteriormente se añade la proteína G36P se forma un complejo difuso que migra lentamente en el gel. Para determinar si las dos proteínas G35P y G36P se acomodan juntas en la misma molécula de DNA generando este complejo, o si este complejo sólo se debe a la unión de la proteína G35P al DNA utilizamos la técnica de la inmuno-retardo.

Se incubó el DNA de cadena sencilla A2 (0,4 nM) marcado radioactivamente con G35P 60 nM (**Figura 42**, en las calles 2, 8 y 14) o con G35P 30 nM (**Figura 42**, en las calles 4, 10 y 16) durante 20 minutos a 37 °C en tampón D con 2,5 mM MgCl₂. Luego, una alícuota de la mezcla de reacción (20 µl) se incubó con 1 µl de PBS 1X (calles 2 y 4), una alícuota con 1 µl de una dilución 1:20 de anticuerpos anti-G35P (calles 8 y 10) y otra con 1 µl de una dilución 1:10 de anticuerpos anti-G36P (calles 14 y 16) durante 5 minutos a 37°C. En la **Figura 42** se observa que incubando el DNA con la proteína G35P se forma el complejo G35P-DNA (calles 2 y 4), cuya movilidad varía sólo en presencia de su propio anticuerpo (calles 8 y 10), dando lugar a un complejo más grande que se queda en el pocillo. Además, el oligo A2 marcado radioactivamente se incubó con G36P (0,9 nM) durante 10 minutos a 37 °C en tampón D con 2,5 mM MgCl₂. Luego se alícuoteó la reacción en 20 µl y se añadió o bien 1 µl de PBS 1X (**Figura 42**, calle 6), o bien 1 µl de anticuerpos diluidos como anteriormente indicado, anti-G35P en la calle 12 y anti-G36P en la calle 18. Las reacciones se incubaron durante 5 minutos más a 37 °C. En **Figura 42** se observa que, a esta concentración, la proteína G36P sólo forma con el DNA el complejo II (calle 6). Al añadir anticuerpos, nuevamente se observó que la movilidad del complejo G36P-DNA está afectada sólo por la presencia del anticuerpo contra la propia proteína (calle 18). Estos resultados mostraban que los anticuerpos reconocían específicamente los complejos G35P-DNA y G36P-DNA.

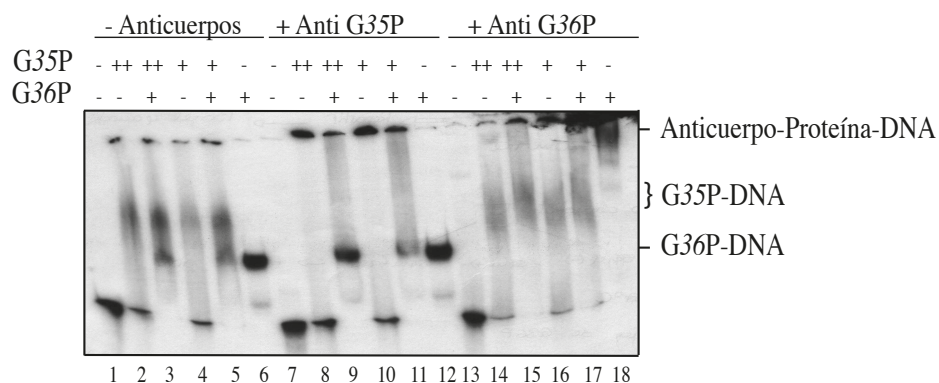


Figura 42. G35P y G36P forman sobre DNA de cadena sencilla dos complejos independientes. Se incubó el DNA A2 de 114 nt marcado radioactivamente (0,4 nM) con G35P 60 nM (en las calles 2, 8 y 14) o con G35P 30 nM (en las calles 4, 10 y 16) durante 20 min a 37 °C en tampón D con 2,5 mM MgCl₂. Donde indicado, tras 10 minutos de incubación con G35P 60 nM (++) o 30 nM (+) se añadió la proteína G36P (0,9 nM) y se incubó la reacción en el mismo tampón durante 10 minutos más a 37 °C. A continuación a 20 µl de cada reacción se añadió o 1 µl de PBS 1X (carriles 1-6), o bien, desde el carril 7 hasta el 12, 1 µl de anti-G35P (dilución 1:20 en PBS 1X), o bien, desde el carril 13 hasta el 18, 1 µl de anti-G36P (dilución 1:10 en PBS 1X). Las reacciones se incubaron durante 5 minutos a 37 °C y sucesivamente se pararon con un tampón de carga. Los complejos se separaron en un gel de poliacrilamida del 5% en tampón Tris-Glicina. La calle 1 no lleva proteína.

Si las dos proteínas forman un complejo mixto sobre el DNA se esperaría que ambos anticuerpos puedan retrasar el complejo formado por las dos proteínas con DNA. Se incubaron dos concentraciones diferentes de G35P (60 nM y 30 nM, respectivamente, en las calles 3 y 5 de la **Figura 42**) durante 10 minutos a 37 °C y posteriormente se añadió una cantidad fijada de G36P (0,9 nM), y se incubó durante 10 minutos a la misma temperatura, en tampón D con 2,5 mM MgCl₂. A continuación se incubaron 20 µl de la mezcla de reacción, o bien con PBS 1X, o bien con los anticuerpos anti-G35P o anti-G36P (respectivamente, diluidos 1:20 y 1:10 en PBS 1X) durante 5 minutos a 37 °C. En la **Figura 42** se observa que cuando se incubaba la mezcla de reacción con PBS 1X, G35P y G36P dan lugar a dos complejos con movilidad diferente (calles 3 y 5), como los observados anteriormente a altas concentraciones de G36P. Incubando la reacción con anticuerpo anti-G35P observamos que el complejo con menos movilidad desaparece, y que el complejo II formado por G36P se mantiene (calles 9 y 11). Asimismo, si añadimos a la reacción anticuerpos anti G36P, observamos sólo la desaparición del complejo II (calles 15 y 17). Con estos resultados se demuestra que, en las condiciones probadas, las proteína G35P y G36P forman dos complejos independientes sobre el DNA de cadena sencilla.

4.2.13 G36P inhibe la reacción de anillamiento catalizada por G35P

Se estudió el efecto de la proteína G36P en la reacción de anillamiento catalizada por G35P. Para ello, utilizamos un DNA de doble cadena de 416 pb marcado en el 5' descrito en el párrafo 4.2.8. Desanillamos el DNA incubándolo 5 min a 100 °C y lo ponemos rápidamente en hielo (**Figura 43**, calle 4). A continuación incubamos el DNA desnaturalizado (0,5 nM) con G35P (25 nM) 10 min a 37 °C y posteriormente añadimos concentraciones crecientes de G36P (de 0,75 a 25 nM) e incubamos durante 10 min a 37 °C en 20 µl de tampón 25 mM Tris HCl pH 7,5, 5 mM β-mercaptoetanol, 50 µg/ml BSA, 50 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂. Repetimos la misma reacción en orden inverso, añadiendo antes la proteína G36P y tras 10 minutos de incubación a 37 °C la proteína G35P, en el mismo tampón de reacción descrito anteriormente. Las muestras se desproteinizaron a los 20 minutos de incubación total mediante la adición de proteinasa K 2,5 mg/ml, SDS 2% y EDTA 30 mM durante 20 min a 37 °C, y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 5% en tampón Tris 25 mM, glicina 250 mM, pH 8. La electroforesis se realizó a 180 V durante 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente se secó el gel y se reveló por autorradiografía.

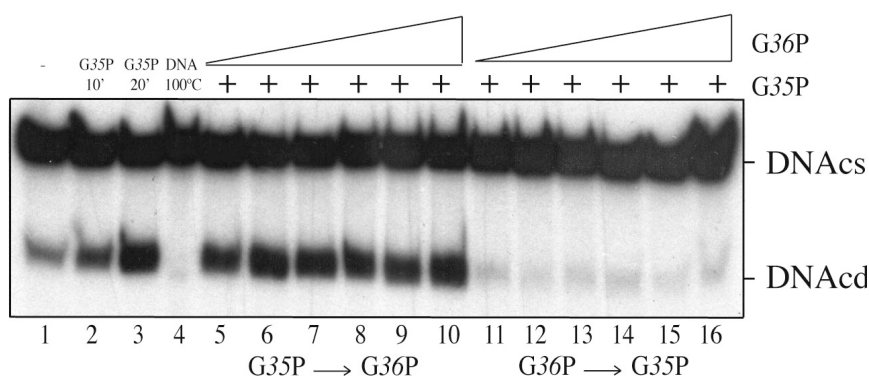


Figura 43. Reacción de anillamiento en presencia de G35P y G36P. Se calentó el fragmento de DNA de 416 pb marcado radioactivamente a 100 °C durante 5 min (calle 4). Se puso rápidamente en hielo y se incubó a 37 °C con G35P (25 nM) durante 10 o 20 min (calles 2 y 3 respectivamente) en tampón 25 mM Tris HCl pH 7,5, 5 mM β-mercaptoetanol, 50 µg/ml BSA, 50 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂. En la calle 1 se observa el anillamiento espontáneo tras 20 min de incubación a 37 °C en ausencia de proteínas. De la calle 5 a la 8 preincubamos el DNA con G35P (25 nM) y tras 10 min a 37 °C se añadieron concentraciones crecientes de G36P (de 0,75 a 25 nM), y de la calle 11 a 16 se preincubó el DNA con concentraciones crecientes de G36P y tras 10 min a 37 °C se añadió G35P (25 nM). Luego, las reacciones se pararon con un tampón de desproteinizante y se corrieron en un gel de poliacrilamida del 5% con tampón Tris-Glicina.

En el carril 1 de la **Figura 43** observamos que en ausencia de proteínas, aproximadamente el 10% del DNA a los 20 minutos de incubación se anilla espontáneamente; sin embargo, a los 10 y a los 20 minutos de incubación con G35P la proporción de DNA de doble cadena aumenta (calle 2 y 3).

Si incubamos el DNA con G35P durante 10 minutos y después añadimos concentraciones crecientes de la proteína G36P no observamos en estas condiciones que la reacción de anillamiento se estimule (**Figura 43**, carriles 5 a 10). Sin embargo, si incubamos el DNA previamente con la proteína G36P, y a los 10 minutos añadimos la recombinasa G35P observamos que la reacción se inhibe y que no se forma como producto final el DNA de doble cadena.

4.3 Caracterización de la proteína G44P

La caracterización de la proteína G44P, se llevó a cabo con la colaboración de la Licenciada Lisa Zecchi.

Según el modelo actual propuesto, el fago SPP1 para llevar a cabo el cambio de replicación tipo θ a replicación tipo σ , requiere una parada de la replicación. Este parada, generaría una rotura de la doble cadena que es procesada por la exonucleasa G34.P, que facilita un sustrato de cadena sencilla a la recombinasa G35P (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2005). Esta última proteína cataliza la invasión de doble cadena en una región del DNA de SPP1 todavía no identificada, generando un intermedio de recombinación (**Figura 5**). La resolución de esta estructura podría ser catalizada o, por una proteína del hospedador que no se ha analizado hasta el momento, o bien por una resolvasa de SPP1 actualmente desconocida.

Con la intención de encontrar nuevas proteínas de SPP1 implicadas en este proceso, se encontró que el gen 45 de SPP1 tenía homología de secuencia con proteínas que pertenecen a la superfamilia de RusA (Pfam 05866). La proteína RusA de *E. coli* (Bolt, *et al.*, 2000) es una resolvasa de estructuras de Holliday codificada por el profago Rac (Chan, *et al.*, 1997, Sharples, *et al.*, 2002, Macmaster, *et al.*, 2006). Normalmente estas proteínas están formadas por unos 120 residuos, mientras que, según la secuencia nucleotídica del genoma de SPP1 publicada (Chai, *et al.*, 1993), el gen 45 codifica una proteína de sólo 59 aminoácidos que parecía haber perdido el dominio N-terminal de proteínas tipo RusA, en el cual se han mapeado residuos importantes para la unión a DNA y la especificidad de corte (Macmaster, *et al.*, 2006). Para comprobar esta delección se volvió a secuenciar la región final del operón E₂ (correspondiente a los genes 44 y 45) y se descubrió un error en la secuencia previamente publicada (Alonso, *et al.*, 1997). Entre la posición 40238 (A) y la posición 40239 (G) de la secuencia de SPP1 existe un residuo adicional (G), de forma que el codón AGT (serina), en la nueva lectura corresponde a un codón de arginina (AGG). La inserción de este nucleótido cambia el esquema de lectura abierto, por lo que resulta que el gen 44 no termina 18 aa después de esta posición, sino que el marco de lectura continúa, de modo que los genes 44 y 45 constituyen un único gen que codifica por una proteína de 236 aa (**Figura 44**). A este gen, con homología de secuencia a la familia RusA, se le renombró como gen 44.

La familia de proteínas RusA se encuentra ampliamente distribuida en bacterias y fagos con más de 700 representantes (Pfam 05866). Casi sin excepción, estas proteínas contienen alrededor de 120 residuos, mientras que el gen 44 da lugar a una proteína de mayor tamaño. Una hipótesis es que la traducción podría empezar a partir de una metionina interna localizada en la posición 104 (**Figura 44**, B). En este caso la proteína codificada tendría 133 residuos y un peso molecular de 15.6 kDa, por lo tanto tendría un tamaño más similar a las proteínas de la familia RusA y según el programa ClustalW2 la identidad con RusA de *E. coli* de esta hipotética proteína sería del 26,5%.

Para averiguar cuál de las metioninas se utiliza para el inicio de la traducción de la proteína *in vivo*, se infectó un cultivo de *B. subtilis* con SPP1, y se tomaron muestras de 1 ml de cultivo tras distintos tiempos de infección. Las células se lisaron en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,5% SDS, 150 mM NaCl, se incubaron con lisozima (1 mg/ml) durante 30 min a 37 °C y posteriormente se sonicaron. Después el lisado se centrifugó a 14000 rpm durante 30 min, y se cargaron 50 µl del sobrenadante en un gel SDS-PAGE del 12,5%. Luego se transfirieron las proteínas a una membrana PVDF para su inmunodetección y se analizaron por western-blot con anticuerpos policlonales anti-G44P. En la parte C de la **Figura 44** se demuestra que el fago SPP1 *in vivo* sintetiza a partir de los 5 minutos (calle 3), una proteína que corre en un gel desnaturalizante a la altura de 32,5 kDa aproximadamente; en ningún momento se detecta una banda con mayor movilidad que corra a la altura de 15 kDa.

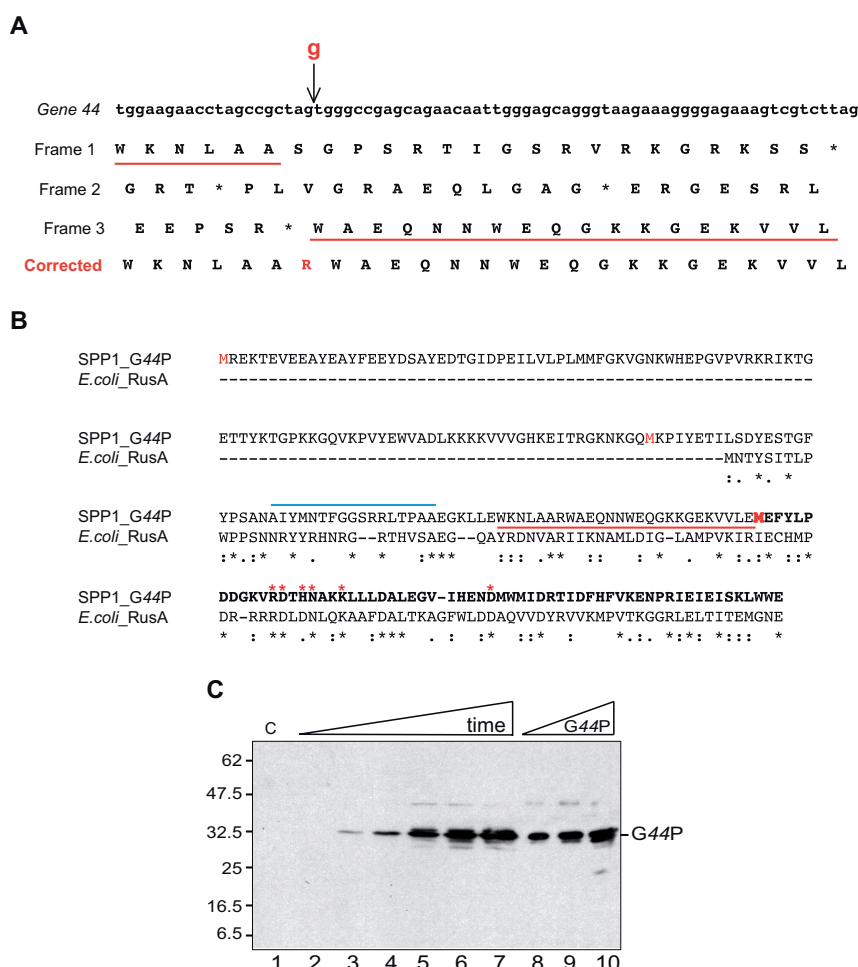


Figura 44. Secuencia correcta del gen 44 y detección *in vivo* de la síntesis de G44P tras la infección con SPP1. En A, parte de la secuencia del gen 44 previamente publicada, en el que se indica con la flecha la posición de la guanina detectada por la nueva secuenciación. En la parte de abajo se indican los tres posibles esquemas de lectura abierta del gen 44 sin la corrección. En rojo se evidencia el cambio de marco de lectura y la secuencia aminoacídica correcta. En B, alineamiento de la proteína RusA de *E. coli* con la secuencia de G44P correcta. En negrita se evidencian los residuos que correspondían a la proteína G45P, y en rojo se marcan las tres posibles metioninas de inicio de lectura. La zona descrita en A, y la región de la proteína que, por homología a RusA de *E. coli* podría estar involucrada en la unión a DNA y en la especificidad de corte, se subrayan, respectivamente, en rojo y en azul. Con los asteriscos rojos se evidencian los aminoácidos que en RusA de *E. coli* son esenciales para la catálisis. En C, células de *B. subtilis* en fase exponencial de crecimiento se infectaron con una moi de 10 con el fago SPP1. Se recogieron muestras cada cinco minutos (desde el tiempo 0 hasta los 25 minutos, de la calle 2 a la 7) y se analizaron mediante western blot. En las calles de 8-10 control de migración con concentraciones crecientes de la proteína G44P purificada (10, 20, y 40 ng respectivamente). En C, extracto celular de un cultivo no infectado. A la izquierda se indica la posición de corrida del marcador de peso molecular en kDa.

4.3.1 Clonaje y purificación de G44P

Para estudiar *in vitro* el posible papel de la proteína G44P en recombinación, se amplificó el gen *44* por PCR y se clonó en el plásmido pET-15b cortado con las enzimas de restricción NcoI y BamHI. El plásmido obtenido fue denominado pET15-G44P y que el clonaje se había realizado sin introducir ninguna mutación se confirmó por secuenciación. El plásmido se transformó en células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS y la proteína se sobreexpresó y se purificó como se ha descrito en materiales y métodos hasta un 95% según se juzgó por geles de SDS-PAGE (Figura 45, A).

El estudio del estado en solución de G44P se realizó utilizando una columna de filtración en gel Superdex 75. El análisis se llevo a cabo a alta fuerza iónica en tampón F con 1 M NaCl. Se cargaron 30 μ g de G44P en un volumen de 200 μ l y la proteína eluyó, comparado con otras proteínas estándar, con un M_r de 54 kDa aproximadamente (Figura 45, B). En estado monomérico la proteína G44P presenta un peso molecular de 27,5 kDa, por lo tanto, este dato indica que la proteína es un dímero a alta sal.

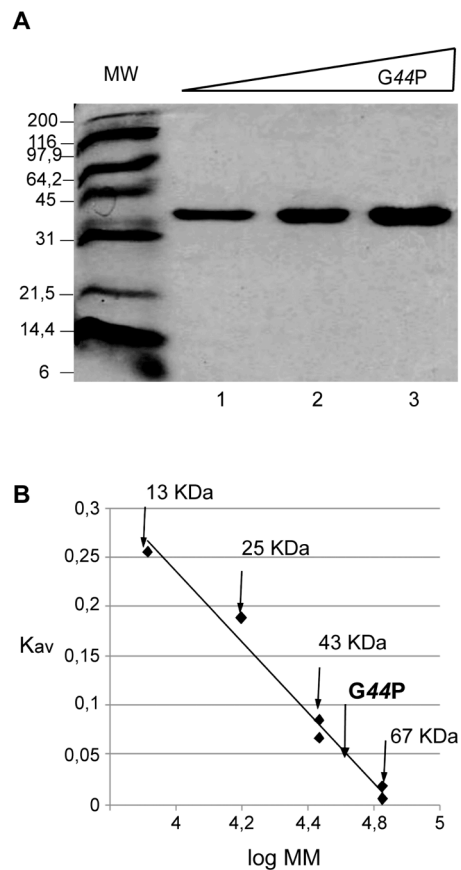


Figura 45. Purificación de G44P y determinación de la masa molecular por cromatografía en filtración en gel. En A Gel SDS-PAGE del 15% donde se muestran concentraciones crecientes de la proteína G44P purificada (1-4 μ g). In B, se representa la k_{av} frente al logaritmo de la masa molecular. Los rombos representan las proteínas patrón utilizadas. La k_{av} de G44P es 0,05, que corresponde a una masa molecular de 54 kDa.

4.3.2 G44P une intermedios de recombinación

Para estudiar la actividad de G44P se incubaron concentraciones crecientes de proteína con diferentes sustratos: DNA de cadena sencilla, DNA de cadena doble, estructuras de Holliday y bucle-D. Para construir las diferentes estructuras se marcó uno de los oligonucleótidos de cada estructura y en tampón fosfato 100 mM pH 7,5 se anilló con una estequiometría 1:2 (caliente: frío) en número de moléculas, o bien con el correspondiente oligonucleótido complementario (DNAcd), o bien con varios oligonucleótidos (bucle-D y estructuras de Holliday). Se calentó la muestra a 100 °C durante 2 min y se dejó bajar la temperatura hasta 30. En la **Figura 7** se describen las estructuras construidas

Se incubaron la distintas estructuras (0,2 nM) con concentraciones decrecientes de G44P en tampón D con 1 mM EDTA. Los complejos se visualizaron mediante electroforesis y autorradiografía.

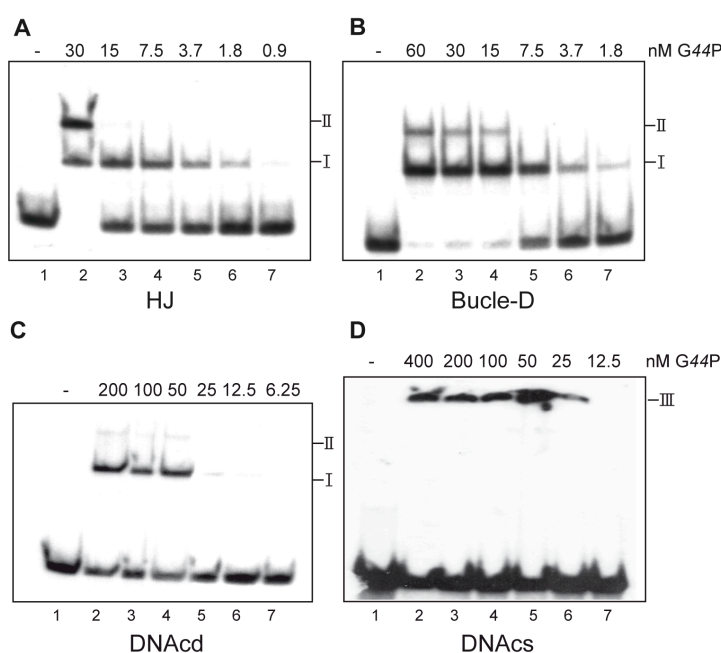


Figura 46. G44P une diferentes sustratos. Se incubaron concentraciones decrecientes (indicadas en la figura) de G44P con 0,2 nM de distintas estructuras de DNA (HJ: estructuras de Holliday en A, bucle-D en B, DNA de cadena doble de 80 pb en C y DNA de cadena sencilla de 80 nt en D). En la figura se indican los 3 complejos formados entre G44P y el DNA: complejo I, complejo II y complejo III.

En la parte A de la **Figura 46** se observa que G44P une estructuras bucle-D y la estructura de Holliday (HJ3) formando dos complejos (complejo I y II). La constante aparente K_{app} calculada en estos ensayos es de ≈ 5 nM para la estructura bucle-D y de ≈ 10 nM para la estructura de Holliday HJ-J3.

La proteína RusA de *E. coli* muestra más afinidad por DNAs de cadena sencilla que por el DNA de cadena doble (Chan, *et al.*, 1998), sin embargo, en la **Figura 46**, se observa que G44P tiene más afinidad por el DNA de cadena doble (con una $K_{app} \approx 48$ nM), y que forma con éste sustrato dos complejos (en C). A altas concentraciones de proteína se observa DNA libre, por lo tanto creemos que el complejo formado entre G44P y el DNA de cadena doble es inestable, y quizás se rompe durante la electroforesis. Finalmente, En la parte D de la **Figura 46** se observa que G44P tiene baja afinidad por DNA de cadena sencilla y que forma un complejo que queda retenido en el pocillo.

4.3.3 G44P resuelve estructuras de Holliday

La proteína RusA de *E. coli* une y resuelve estructuras de Holliday (Chan, *et al.*, 1997). Para saber si G44P además de unir, es capaz de resolver estructuras de Holliday, se llevó a cabo un ensayo de corte. Se incubó la proteína G44P (10 nM) con la estructura estática de Holliday (HJ-23-M), marcada sólo en un extremo 5', durante 30 min a 37 °C, en tampón D con 10 mM $MgCl_2$. (**Figura 47**). En la parte A y B de la **Figura 47** se observa que G44P corta la estructura y que el corte parece ser simétrico, debido a que se observan productos de tamaño similar cuando se marcan los diferentes brazos de la estructura opuestos entre sí. En la parte B se muestra la secuencia de la estructura y los sitios de corte que se deducen de la longitud de los productos de la reacción. La secuencia reconocida en el oligo 17-M es 5'-TAA↓G↓GG-3' mientras en el oligo 19-M la proteína reconoce la secuencia 5'-CCT↓C↓AA-3' y se observa que ambos cortes ocurren a una distancia de 1-2 pb del sitio de entrecruzamiento. Además se observaron cortes en los oligonucleótidos 16-M y 23-M. Incubando la proteína G44P con un DNA de doble cadena que lleva la secuencia 5'-CCTCAA-3' no se observó actividad endonucleasa por lo tanto el corte es específico de estructura (dato no mostrado).

La misma reacción se llevó a cabo sustituyendo el magnesio por manganeso, debido a que la proteína RusA presenta más actividad de corte con este catión (Chan, *et al.*, 1997). Sin embargo, en presencia de 10 mM Mn^{2+} no se observó actividad de corte (dato no mostrado). Finalmente, G44P no es capaz de cortar estructuras tipo horquilla de

replicación formada por anillamiento de los oligos J3-1 y J3-2 (dato no mostrado), por lo tanto parece ser una endonucleasa específica de estructuras de Holliday.

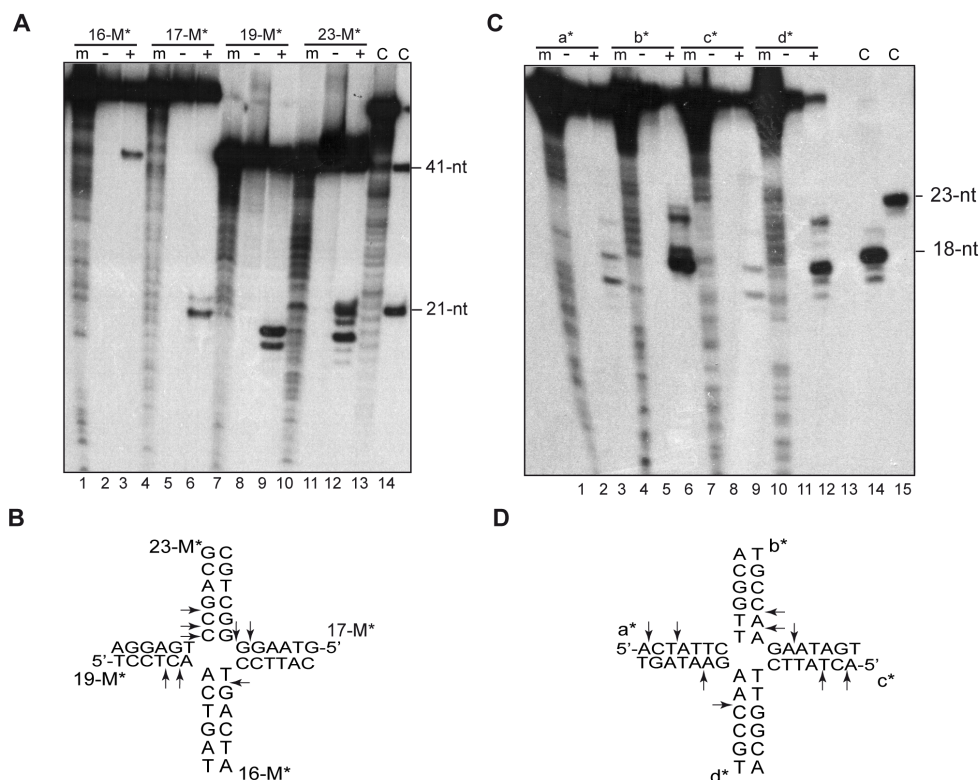


Figura 47. Determinación de la actividad de corte de G44P sobre estructuras de Holliday estáticas y móviles. La estructura de Holliday 23-M estática (en A), y la estructura de Holliday móvil (en C) marcada en la cadena indicada, se incubó con 10 nM de G44P en tampón D con 10 mM MgCl₂ durante 30 min a 37 °C. La reacción se paró con un tampón de carga desnaturizante y los productos se resolvieron en un gel de poliacrilamida del 15% con 8 M urea. “+” y “-” indican, respectivamente, la presencia y la ausencia de la proteína y “m” indica la escalera de secuencia G+A obtenida para el correspondiente oligonucleótido marcado. En el carril C se cargaron como marcadores de peso molecular adicionales, los oligonucleótidos marcados de 41 nt, 21 nt, 23 nt y 18 nt. In B y en D, se indican con flechas los sitios de corte de G44P.

Para corroborar si la proteína G44P requiere una secuencia consenso para su actividad endonucleasa además de la estructura, se utilizó una estructura de Holliday móvil (HJ-Jbm6), que contiene 13 pb homólogos en el centro. Teóricamente, esta estructura puede migrar espontáneamente los brazos en la secuencia central, por lo tanto puede situar varias secuencias de corte en el sitio de entrecruzamiento de ramas (Ayora, *et al.*, 2004). Se incubaron 10 nM de G44P con la estructura HJ-Jbm6 en las mismas condiciones

descritas anteriormente y en la parte C y D de la **Figura 47** se observa que G44P corta simétricamente la estructura en los brazos b y c y que los sitios preferente de corte en los brazos a y b son respectivamente 5'-GGC↓AAG-3' y 5'-AGA↓ATA-3'. Sin embargo, se observan cortes también en otros sitios, por lo tanto la proteína podría tener una especificidad de secuencia limitada.

4.3.4 G44P resuelve bucles-D replicados

En el apartado anterior se demostró que la proteína G44P puede generar una rotura de la doble cadena cortando la estructura de Holliday. Según el modelo actual (**Figura 5**), el cambio de replicación tipo θ a tipo σ se da cuando la proteína recombinasa G35P invade con un DNA homólogo otra molécula de DNA de SPP1. La invasión de cadena genera un intermedio de replicación llamado bucle-D. Una resolvasa podría o bien resolver este intermedio inmediatamente o bien podría resolverlo una vez que la replicación se ha restablecido.

Para estudiar si G44P puede resolver los posibles intermedios de recombinación y replicación que se generan en el cambio de replicación se construyeron, por anillamiento de oligonucleótidos, una estructura de Holliday (**Figura 48**, calles 3 y 4) y diferentes bucle-D que simulan la estructuras que se forman cuando este sustrato está o no replicado (**Figura 48**, de DL-A a DL-F, calles de 5 a 17). En la parte A de la **Figura 48**, se marcó la cadena invasora, y en B la desplazada. Cada sustrato se incubó durante 15 min a 37 °C con G44P (10 nM) en tampón D con 10 mM MgCl₂ y el producto de la reacción se observó en un gel desnaturizante. Como control negativo, se incubó, en las mismas condiciones, la proteína G44P con DNA de cadena sencilla con la misma secuencia (calles 18-19).

Cuando el DNA de cadena sencilla, que lleva el sitio de restricción de G44P 5'-CCTCAA-3', invade un DNA de doble cadena, G44P no muestra actividad de corte si el sitio de restricción se encuentra en una región de cadena sencilla (calles de 12 a 17 de la parte A de la **Figura 48**). Sin embargo, si la cadena invasora proviene de un sustrato de doble cadena, G44P recupera su eficiencia de corte (calles de 5 a 10). Además se observa, que la eficiencia de corte de la proteína G44P depende de la presencia de una región de cadena doble, tanto en la cadena invasora como en la cadena desplazada. En la parte A de la **Figura 48** se observa una mayor eficiencia de corte con el sustrato DL-C, que representa una estructura bucle-D totalmente replicada.

Marcando la cadena desplazada, se observa que G44P corta las estructura con mayor eficiencia cuando ésta cadena ha sido replicada (por lo tanto con sustrato de doble cadena incluso después de la región de entrecruzamiento) (calles 4, 8 y 10 de la parte B de la **Figura 48**). Además se observa un nuevo producto de corte que corre a la altura de aproximadamente 41 nt. Estos resultados indican que G44P tiene mayor eficiencia de corte cuando, tanto la cadena desplazada como la invasora, proveen un sustrato de doble cadena, por lo tanto actuaría una vez que la replicación se ha restablecido.

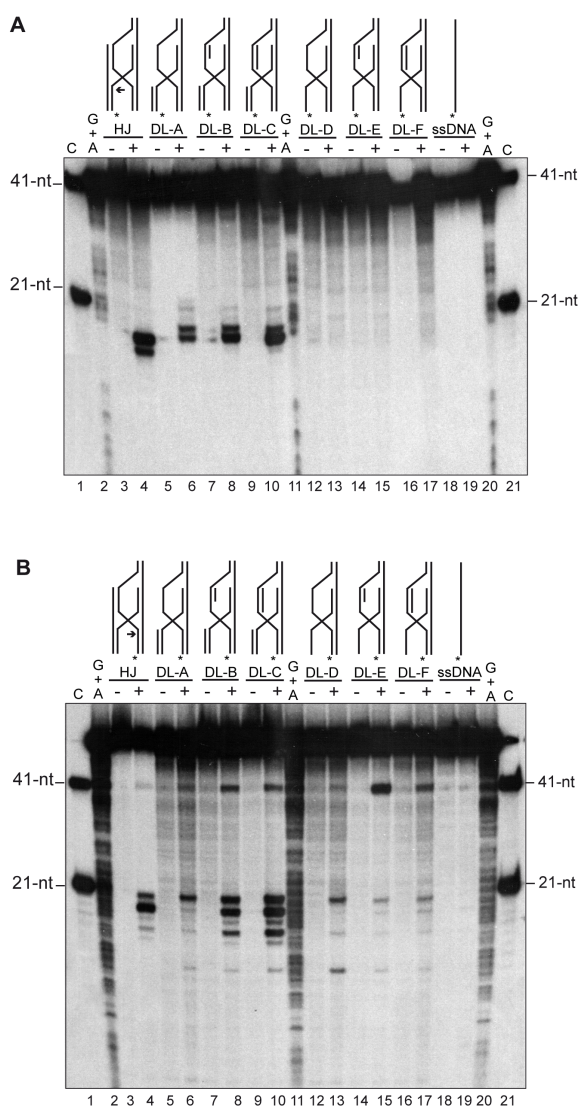


Figura 48. Actividad de corte de intermediarios de recombinación catalizada por G44P. Los intermediarios de replicación, marcados en la cadena invasora en **A** y en la cadena desplazada en **B**, se incubaron con 10 nM de G44P en tampón D con 10 mM MgCl₂ durante 30 min a 37 °C. Las reacciones se pararon con un tampón de carga desnaturalizante y los productos se resolvieron en un gel de poliacrilamida de 20% con 8 M urea. Los dibujos indican los diferentes sustratos utilizados (bucles-D: de DL-A a DL-F, HJ: estructura de Holliday y DNAs: DNA de cadena sencilla). El asterisco indica la cadena marcada en el extremo 5'. En las estructuras de Holliday se indica con una flecha el sitio de corte. Como marcador, se utilizó la escalera de secuencia G+A obtenida por el correspondiente oligonucleótido marcado. En el carril C se cargaron como marcadores de peso molecular adicionales, los oligonucleótidos marcados de 41 nt y 21 nt.

5. DISCUSIÓN

5.1 El comienzo de la replicación en SPP1

Cuando el bacteriófago SPP1 infecta *B. subtilis* inyecta dentro de la célula el 104% de su genoma en forma de DNA lineal de doble cadena. Los extremos del DNA empaquetado son redundantes y facilitan la circularización por un mecanismo desconocido. A continuación, la RNA polimerasa de la célula empieza a transcribir los genes de los operones tempranos que codifican para proteínas implicadas en la replicación. La replicación inicial de SPP1 se ha propuesto que es unidireccional y comienza en un origen. Se postula que la replicación en las primeras etapas es tipo θ y da como producto moléculas circulares de DNA (Ganesan, 1976, Missich, *et al.*, 1997).

Estudios *in vitro* han demostrado que la proteína iniciadora de la replicación G38P une las cajas AB de la región *oriL* y probablemente promueve el desanillamiento de cadenas de la región rica en AT adyacente, sin embargo, también es capaz de unirse a las cajas AB de la región *oriR* (Missich, *et al.*, 1997). *In vivo*, estudios independientes han señalado como posible región de inicio de la replicación el sitio *oriL*, o bien el sitio *oriR*, que se encuentran respectivamente a la izquierda y a la derecha del sitio de empaquetamiento (*pac*) (Ganesan, 1976, McIntosh, *et al.*, 1978, Alonso, *et al.*, 1997, Missich, *et al.*, 1997). Nuestros ensayos de microscopía demuestran que en el plásmido pCB166, que lleva ambas regiones *oriL* y *oriR*, la proteína G38P une simultáneamente las dos regiones promoviendo el apareamiento del DNA (**Figura 8**). Estos datos sugieren que el bacteriófago SPP1 *in vivo* podría utilizar ambas regiones *oriL* y *oriR* para llevar a cabo su replicación. Esta hipótesis está apoyada por los resultados obtenidos con los plásmidos pBT233-*oriL* y pBT233-*oriR*, cuya replicación es masiva cuando las células de *B. subtilis* son infectadas con SPP1 (**Figura 10**).

El apareamiento del DNA observado en presencia de G38P podría revelar un segundo papel para esta proteína en la replicación del genoma. En *E. coli* se ha demostrado que la replicación del factor F está regulada por la proteína iniciadora de la replicación RepE, que cataliza el apareamiento del DNA entre cortas regiones llamadas iterones presentes en el *ori* y en otras regiones llamadas *inc* situadas en *cis*. El apareamiento de estas regiones inhibe la formación del complejo abierto, por lo que la replicación no puede iniciarse (Zzaman & Bastia, 2005). El resultado observado por microscopía podría revelar un papel similar de G38P en el control negativo de la replicación. La proteína G38P

podría ser responsable del inicio de la replicación y de su regulación. Ensayos preliminares de la Doctora E. Seco (de este laboratorio) sugieren que la replicación empezaría en la región *oriL*.

5.2. El cambio de replicación de tipo θ a tipo σ

En la replicación de SPP1 el cambio de replicación de tipo θ a tipo σ es esencial para el correcto empaquetamiento, ya que sólo un DNA concatémico puede ser empaquetado dentro de las procápsides virales. La obtención del DNA concatémico puede darse por vías alternativas. En virus con DNA lineal, como el bacteriófago T4, se generan concatémeros mediante una replicación dependiente de recombinación. En virus con DNA de doble cadena circular como λ , herpes simplex tipo I o SPP1, la replicación inicial es de tipo θ sin embargo, este tipo de replicación cesa, a favor de una replicación tipo σ que da lugar a una síntesis masiva de DNA concatémico (Lo Piano, *et al.*, 2011). El mecanismo mediante el cual estos virus cambian el tipo de replicación de θ a σ aún no se conoce, e incluso se han reportado resultados contradictorios. Así, algunos estudios proponen que en el sistema de λ la replicación comienza mediante un mecanismo tipo θ y después de 15 minutos sólo hay replicación unidireccional tipo σ . Otros estudios reportan que el 40% de la replicación tipo λ comienza en *ori* (Better & Freifelder, 1983) y que no existe un momento en el que se da el cambio de un tipo de replicación a otro, sino que la replicación tipo θ y σ comienzan al mismo tiempo (Better & Freifelder, 1983). Se postula que el cambio de replicación en el sistema de λ puede depender, o bien de la concentración de la proteína DnaA (Taylor & Wegrzyn, 1995, Wegrzyn & Wegrzyn, 2005), o bien de la inestabilidad de la proteína organizadora del replisoma O (Narajczyk, *et al.*, 2007).

Según el modelo propuesto por nuestro grupo de investigación, la replicación de SPP1 comenzaría en un origen de replicación (*oriL*) y tras una o más rondas de replicación la fuerte unión de G38P al otro origen de replicación (*oriR*) provocaría una parada de la maquinaria de replicación. Para comprobar esta hipótesis en primer lugar se analizó *in vivo* si SPP1 puede replicar un DNA a partir de la región *oriR*, y en caso positivo qué tipo de replicación se da a partir de este origen. Para ello, se utilizó el plásmido pBT233 (Ceglowski, *et al.*, 1993) donde fueron clonadas distintas regiones de SPP1 y la cepa de *B. subtilis* BG193, que lleva la mutación termosensible *dnaB37* (Levine, *et al.*, 1987). La

replicación del plásmido pBT233 es de tipo θ y es dependiente de la proteína DnaB (Lioy, *et al.*, 2010). En el mutante termosensible *dnaB37*, al pasar los cultivos a temperatura no permisiva, se consigue bloquear la replicación plasmídica debida a la maquinaria de replicación celular. En estas condiciones se han infectado las células con el fago SPP1 y se ha analizado la replicación plasmídica iniciada por las proteínas virales. Nuestra hipótesis era que para que la replicación dependiente de recombinación comience, se requiere que la replicación tipo θ inicie desde un origen (el del plásmido pBT233 por ejemplo) y que se pare en algún momento. A continuación, la proteína recombinasa G35P ensamblaría en una región una replicación dependiente de recombinación. Si esta región fuera un origen (*oriL* o *oriR*), podría necesitar de la proteína iniciadora para ensamblar la replicación tipo σ , mientras que si G35P no requiere más que una parada de la replicación, no necesitaría más que esta parada (provocada en los ensayos realizados por el cambio de temperatura de 30 °C a 50 °C con lo que se inactiva la proteína DnaB) y no se requeriría ninguna región específica ni G38P. Infectando los cultivos a temperatura no permisiva con el fago mutante en G38P, hemos observado que esta proteína se necesita tanto para la replicación tipo θ , como para la replicación tipo σ , iniciada desde *oriL* o *oriR*. Sin embargo, los resultados obtenidos infectando las cepas *dnaB37* con el fago termosensible mutante en G35P (*tsI20F*) que llevan el plásmido pBT233 con una región *ori* revelan que la proteína recombinasa G35P solo se requiere para la replicación tipo σ (**Figuras 13 y 14**). Ensayos *in vitro* han demostrado que la proteína G38P tiene, además de un papel como proteína iniciadora de la replicación desde un origen, un papel adicional, G38P se requiere para el cargado de la helicasa G40P en intermedios de replicación de tipo círculo rodante que no poseen una región *ori*, en un papel similar al de la proteína PriA de bacterias (Seco, *et al.*, 2013). Sin embargo, los resultados obtenidos *in vivo* infectando con SPP1 las cepas *dnaB37*, indican que tanto la replicación tipo θ , como la replicación tipo σ , requieren una región *ori* de SPP1 (*oriR* u *oriL*, **Figura 10**) y que la replicación no se dispara en presencia de una región de homología con el DNA de SPP1 (con el plásmido pBT233-400HR por ejemplo, **Figura 12**). Por lo tanto es posible que ambos tipos de replicación requieran que G38P esté unida a *oriR* u *oriL*.

El cambio de replicación tipo θ a tipo σ podría darse o bien por la presencia de la proteína G38P unida a las cajas AB de la región *oriR* o *oriL*, o bien, es posible que, en la cepa *dnaB37*, con una cierta frecuencia, la parada de la replicación producida al pasar a la temperatura no permisiva genere una rotura de doble cadena de DNA como se ha observado en *E. coli* (Michel, *et al.*, 1997). Para estudiar si la replicación concatémica está inducida por una rotura de la doble cadena, se introdujo en el cromosoma de la cepa

de *B. subtilis* el gen que codifica para la endonucleasa *SceI* y en el plásmido pBT233 su secuencia de corte. Los ensayos mostrados en este trabajo demuestran que las proteínas de SPP1 pueden desencadenar una replicación concatémica tras el corte de la doble cadena de DNA provocado por la endonucleasa *SceI* (**Figura 15**). Además, los resultados indican que, en este caso, la replicación tipo σ puede ensamblarse en ausencia de una región *ori* específica de SPP1. Estos resultados indicarían que el cambio de replicación de tipo θ a tipo σ en SPP1 se da o bien, cuando hay una rotura de la doble cadena (en nuestro experimento por la presencia de la endonucleasa *SceI* que produce un corte de la doble cadena de DNA), o bien cuando se induce una parada de la replicación (inactivando la proteína *DnaB*) y la proteína G38P está unida a uno de los dos orígenes de replicación. Los resultados obtenidos indican que en los mutantes *dnab37*, si bien existe una parada de la replicación debida al cambio a temperatura no permisiva, probablemente no se genera una rotura del DNA de doble cadena puesto que en la cepa *dnab37* que lleva el plásmido pBT233 no se observó replicación masiva tras la infección con SPP1 (**Figura 9**). Es posible que el solo cambio de temperatura y la consecuente inactivación de la proteína *DnaB* no son causas suficientes para generar una total parada de la horquilla de replicación y la generación de una rotura de la doble cadena. Por lo tanto, según nuestros resultados la replicación concatémica requiere una parada de replicación y la unión de G38P a una región *ori*. Esta unión podría provocar un colapso de la horquilla de replicación, con consecuente rotura de la doble cadena de DNA. Es nuestra hipótesis que en este momento actuarían las proteínas G34.1P y G35P, que podrían ser reclutadas en la región *ori* a través de la interacción entre G38P y G35P, y quizás la proteína G35P podría desplazar a G38P de la región *ori*. Para determinar si la proteína G38P se requiere para ensamblar la replicación tipo σ desde una rotura de doble cadena, disponíamos del mutante en G38P termosensible (*ts3B*) y hemos infectado con este mutante el cultivo de *B. subtilis* que lleva integrado en el cromosoma la endonucleasa *SceI* y su sitio de corte en el plásmido pBT233. Al infectar con el fago mutante a 50 °C esta cepa, no se detectó replicación masiva sin embargo, al hacer el control de infección con el fago silvestre a 50 °C se detectó una atenuación de la replicación tipo σ respecto a la que se había observado realizando el experimento a 37 °C (datos no mostrados). Por lo tanto, el resultado obtenido con el mutante termosensible *ts3B* no se ha considerado indicativo en cuanto es posible que la endonucleasa *SceI* no tenga la misma actividad catalítica a 50°C. Sin embargo no se descarta que la proteína G38P pueda tener un papel indispensable para la replicación concatémica, ya que *in vitro* se ha demostrado que el cargado de la helicasa G40P de SPP1 en el DNA se debe a esta proteína (Seco, *et al.*, 2013).

Nuestros resultados revelan para los orígenes *oriL* y *oriR* y la proteína G38P un papel clave en el cambio de replicación. Sin embargo, otra proteína esencial para la formación de DNA concatémico es G35P. Los resultados muestran que la replicación concatémica requiere una región *ori*, y en la **Figuras 13 y 14** se observa que a falta de la acción de la proteína recombinasa, ninguna otra proteína viral o celular es capaz de ensamblar una replicación dependiente de recombinación. Es nuestro postulado que la supuesta interacción entre G38P y G35P tenga un papel clave en el cambio de replicación de tipo θ a tipo σ debido a que la proteína G35P podría actuar desplazando la proteína G38P del origen.

5.3. Proteínas de recombinación de SPP1 implicadas en replicación

5.3.1 La proteína G36P

Las proteínas tipo SSB están implicadas en los procesos de replicación, recombinación y reparación de DNA. Se desconocía si el bacteriófago SPP1, para la replicación de su DNA, utiliza su propia proteína de unión a cadena sencilla G36P, la proteína SsbA del huésped, o ambas. Ensayos *in vitro* han demostrado que para la replicación concatémica la maquinaria de replicación puede utilizar ambas proteínas (Seco, *et al.*, 2013). Sin embargo, los ensayos realizados *in vivo* indican que el dominio C-terminal de la proteína SsbA, que es esencial para la replicación de la bacteria, no se requiere para la replicación *in vivo* de SPP1. Por lo tanto, o bien SPP1 podría utilizar cualquiera de las dos proteínas de unión a cadena sencilla, o bien la proteína G36P podría ser la única proteína de unión a cadena sencilla que actúa en el replisoma de SPP1. Al no tener un mutante de SPP1 en la proteína G36P no hemos podido descartar ninguna de estas dos hipótesis.

G36P es una proteína de 17 kDa. Se sabe que la mayoría de las SSBs con peso molecular similar forman tetrámeros, como las SSB de *E. coli* y del fago P1 (Bendtsen, *et al.*, 2002). Sin embargo, también se han descrito SSBs diméricas en *Thermus Thermophilus*, *Thermus aquaticus* y *Deinococcus radiodurans* (Dabrowski, *et al.*, 2002, Eggington, *et al.*, 2004), SSBs monoméricas en virus (T4, gp32 o P5) y en arqueas (Kelly, *et al.*, 1998, Miller, *et al.*, 2003) y por último SSBs que forman un homotrímero como en el caso de

RPA en eucariotas (Brill & Stillman, 1991). El análisis bioquímico ha demostrado que G36P y los mutantes de delección $\Delta C9$, $\Delta C15$, y $\Delta C21$ forman tetrámeros en solución (**Figura 17 y 19**) según la técnica utilizada. El dominio C-terminal de la proteína G36P, al igual que el dominio C-terminal de la proteína SSB de *E. coli*, no está involucrado en el mantenimiento del homotetrámero (Raghunathan, *et al.*, 1997). G36P y los mutantes de delección construidos son capaces de unir un DNA de cadena sencilla de 114 nt formando en un gel de retraso dos complejos bien definidos (**Figura 20 y 21**), que corresponderían a la unión de uno y dos tetrámeros al DNA, lo que indicaría que al igual que SSB de *E. coli*, un tetrámero de G36P cubre unos 60 nt. La proteína SsbA de *B. subtilis* forma con DNA de cadena sencilla de más de 60 nt complejos estables (Yadav, *et al.*, 2012), al igual que la proteína SSB de *E. coli* (Meyer & Laine, 1990). A diferencia de SSB de *E. coli* la proteína G36P, bajo las condiciones probadas, no forma un complejo estable con un DNA de 80 nt, ya que solo el alrededor del 20% de los complejos se mantienen tras la adición de un competidor. Además, los mutantes de delección de G36P forman con el sustrato de cadena sencilla un complejo aún menos estable (**Figura 22**). Conforme aumenta el tamaño de la delección se observa una disminución de la estabilidad del complejo DNA-proteína, resultando el mutante $\Delta C21$, el más inestable. En *E. coli* se ha publicado que la delección del extremo C-terminal de SSB (últimos 35 aa), desplaza el equilibrio hacia el modo de unión altamente cooperativo (SSB)₃₅, donde 35 nucleótidos interaccionan con dos monómeros de SSB (Roy, *et al.*, 2007), además se ha descrito que este mutante demuestra una mayor afinidad de unión para el DNA de cadena sencilla y una mayor capacidad de desestabilización de la hélice en comparación con la proteína nativa (Meyer & Laine, 1990).

En otros sistemas como *E. coli* y *B. subtilis* la proteína de unión a cadena sencilla interacciona y modula la actividad de varias proteínas implicadas en la replicación y en la recombinación del DNA. Hasta el momento se ha demostrado que SSB de *E. coli* interacciona a través del dominio C-terminal ácido con 14 proteínas (Shereda, *et al.*, 2008), mientras la SsbA de *B. subtilis* interacciona a través del mismo dominio con 12 proteínas (Costes, *et al.*, 2010).

Las proteínas de replicación para las que se ha observado una interacción con SSB de *E. coli* hasta el momento son: DnaG y la subunidad χ del cargador del factor de procesividad (Kelman, *et al.*, 1998). En *B. subtilis* el complejo DnaX está formado por la subunidades $\tau\delta\delta'$, y la presencia de la subunidad χ no es evidente en bacterias Gram-positivas (Noirot-Gros, *et al.*, 2002). Se sabe que SSB de *E. coli* interacciona con la proteína DnaG primasa, siendo la interacción mediada por los dominios C-terminales de ambas proteínas (Naue, *et al.*, 2013). Además se ha demostrado que la presencia de SSB refuerza la

asociación entre la primasa y los cebadores de ARN sintetizados por esta (Yuzhakov, *et al.*, 1999). La interacción χ -SSB destruye la interacción entre la primasa y los cebadores de RNA, permitiendo que se produzca la unión de la subunidad γ (cargador del anillo) al híbrido DNA-RNA (Yuzhakov, *et al.*, 1999). Finalmente SSB interacciona, a través del dominio C-terminal, con la helicasa PriA y estimula su actividad (Cadman & McGlynn, 2004). Hemos demostrado, que en las condiciones probadas, la proteína G36P interacciona fuertemente con dos proteínas implicadas en la replicación. G36P interacciona fuertemente con la helicasa replicativa G40P (**Figura 24**), codificada por el bacteriófago SPP1, y con la proteína τ codificada por *B. subtilis* (**Figura 28**). Este resultado podría indicar que en *B. subtilis* donde no es evidente la presencia de las subunidades χ y γ , la interacción entre la proteína de unión a cadena sencilla SsbA y el cargador del factor de procesividad se podría dar a través de la subunidad τ .

La interacción entre G36P y G40P o τ no está mediada por el dominio C-terminal de G36P, sin embargo, los últimos 21 aminoácidos del dominio C-terminal de G36P podrían ser responsables de la débil interacción entre G36P y G38P (**Figura 25**). Puesto que el dominio C-terminal ácido Asp-Phe-Asp-Asp-Asp-Ile-Pro-Phe de la proteína SSB de *E. coli* está muy conservado entre las proteínas tipo SSBs (Lu & Keck, 2008), y puesto que este dominio en muchos sistemas es responsable de las interacciones con las proteínas del replisoma (Shereda, *et al.*, 2008), era de esperar que, por similitud de secuencia, el dominio C-terminal G36P fuese responsable de las interacciones proteína-proteína detectadas. Los resultados obtenidos mediante ensayos de precipitación con sulfato de amonio contrastan esta hipótesis y nos indican que la proteína G36P interacciona con varias proteínas implicadas en la replicación a través de un dominio aún no identificado.

Aunque los mutantes de G36P tengan una actividad bioquímica parecida a la de la proteína silvestre, las mutaciones en el dominio C-terminal de G36P afectan a la replicación *in vitro* de SPP1 (**Figura 29**). Reconstituyendo el replisoma de SPP1 *in vitro* y sustituyendo la proteína G36P silvestre por los mutantes de delección de G36P, se observó una síntesis inferior de DNA, incluso menor a la que se observa en presencia de G36P, lo que viene a decir que el extremo carboxilo de G36P se necesita para que la horquilla de replicación progrese. Probablemente los nueve últimos aminoácidos de G36P, como se ha visto para SsbA de *Bacillus subtilis*, están involucrados en la interacción de G36P con otra/otras proteínas del replisoma no ensayadas en esta tesis (DnaE, por ejemplo) cuya interacción sería necesaria para la replicación, o bien la replicación estaría afectada por la menor estabilidad del complejo DNA-proteína tipo SSB. Recientemente se ha publicado que la proteína SsbA y DnaE de *B. subtilis* interaccionan (Rannou, *et al.*, 2013).

La función de las proteínas de cadena sencilla es principalmente proteger el DNA de cadena sencilla de la degradación y mediar la interacción con otras proteínas. Durante la iniciación de la replicación probablemente G36P es una de las primeras proteínas que se sitúa en el complejo abierto y no se puede descartar que G36P actúe como una proteína desestabilizadora de la hélice ayudando a G38P a que el complejo abierto se extienda. Sin embargo, la falta de estabilidad entre el complejo DNA-proteína podría llevar a interferir en la elongación del DNA, puesto que las regiones de cadena sencilla no estarían correctamente protegidas y que las cadenas recién desanilladas por la helicasa replicativa se podrían volver a anillar. No existen mutantes de SPP1 en el dominio C-terminal de G36P, por lo tanto no sabemos si *in vivo* el dominio C-terminal de esta proteína es esencial, sin embargo se ha comprobado *in vitro* que la replicación puede ser llevada a cabo en presencia de G36P como única proteína de unión a cadena sencilla.

Respecto a las proteínas de recombinación que interaccionan con G36P, se había demostrado anteriormente que la proteína G36P interacciona con la proteína recombinasa G35P (Ayora, *et al.*, 2002) y en este trabajo mediante precipitación con sulfato amónico se ha comprobado esta interacción (**Figura 31**), lo que se discutirá posteriormente. Por último hemos demostrado que la proteína G36P interacciona con la resolvasa G44P. La proteína SSB de *E. coli* interacciona también con proteínas implicadas en la recombinación del DNA, como por ejemplo las helicasas RecQ (Shereda, *et al.*, 2007) y RecG (Lecointe, *et al.*, 2007), con la exonucleasa RecJ (Han, *et al.*, 2006) y con el mediador RecO (Umezú & Kolodner, 1994). Además en *B. subtilis* se ha demostrado que la proteína SsbA interacciona con las helicasas RecS y RecQ (Costes, *et al.*, 2010), homólogas a la proteína RecQ de *E. coli*. Hasta el momento, no se han estudiado en otros sistemas posibles interacciones entre proteínas de unión a cadena sencilla y proteínas resolvasas de estructuras de Holliday y el significado de la interacción observada entre G36P y G44P de SPP1 queda aún por determinar.

Resumiendo, en esta tesis hemos demostrado que 5 proteínas, implicadas en procesos de replicación y recombinación de DNA, interaccionan con la proteína G36P de SPP1 y que la mayoría de estas interacciones no se dan a través del dominio C-terminal. El significado de las interacciones observadas queda en la mayoría de los casos por determinar, pero se podría especular que quizás la proteína G36P, al igual que la proteína SSB de *E. coli*, sea la proteína encargada de organizar y modular la interacción entre las numerosas proteínas que constituyen el replisoma de SPP1.

5.3.2 La proteína G35P

La proteína G35P es una proteína de 32 kDa. Es capaz de unir DNA de cadena doble y de cadena sencilla y catalizar una reacción de anillamiento de cadenas entre un DNA de cadena sencilla circular y una cola homóloga 3' de un DNA de cadena doble, independientemente de ATP (Ayora, *et al.*, 2002). La secuencia de G35P tiene un 40% de identidad con la proteína RecT del profago *Rac* de *E. coli*. Las proteínas G35P, RecT y Red β del fago λ pertenecen a la familia de recombinasas tipo Red β que a su vez, se encuentra dentro de la superfamilia de recombinasas tipo Rad52 (Lopes, *et al.*, 2010). Aún se desconoce el modo de acción de estas recombinasas y los estudios de mutagénesis para identificar aminoácidos esenciales son escasos y se han realizado solo con Red β , cuya identidad de secuencia con G35P es baja.

Recientemente, mediante el alineamiento de las secuencias de las proteínas que pertenecen a la superfamilia Rad52 se ha identificado un residuo de arginina/lisina (K152 en Rad52 y R161 en Red β), altamente conservado en las proteínas tipo Red β (Lopes, *et al.*, 2010). En su lugar, en la proteína RecT y G35P, se halla un residuo cargado negativamente (D180 en G35P) (Datta, *et al.*, 2008). Mutando en Red β el aminoácido R161 por una cisteína, la eficiencia de anillamiento de la proteína se ve afectada 1000 veces, por lo tanto, este aminoácido cargado positivamente tiene un papel crítico en la actividad de la proteína (Lopes, *et al.*, 2010). Otro estudio ha determinado mediante ensayos de proteólisis y protección con biotina que la proteína Red β presenta tres dominios: un dominio N-terminal "core" (residuos 1-130), una región "central" (residuos 131-177) y una región C-terminal (residuos 178-261). Según el estudio, la región C-terminal no se requiere para la unión a DNA puesto que el mutante de delección 1-177 une DNA con la misma afinidad que la proteína silvestre. El mismo estudio ha revelado que mutando por alanina algunos residuos de lisina presentes en la secuencia 1-177, la capacidad de unión a DNA se destruye en este orden de gravedad K172A > K36A > K69A > K11A (Wu, *et al.*, 2006). En G35P solo los residuos K36 y K172 están conservados y corresponden a los residuos K48 y K190 de la proteína (Datta, *et al.*, 2008).

Un estudio sobre la estructura por NMR de proteínas similares a Rad52 ha demostrado que las proteínas que catalizan apareamiento de cadenas homólogas (HP), que no requieren ATP como cofactor, como por ejemplo RecT de *Rac*, Mhr1 de levadura, y RecO de bacterias, unen DNA de cadena sencilla de forma similar a las proteínas RecA de *E. coli* y Rad51 de humanos en presencia de cofactor. La característica común de estas proteínas es que no unen el DNA por apilamiento de bases, sino que mediante una

interacción hidrófoba entre el grupo 2' metileno de la desoxirribosa y la base siguiente (Masuda, *et al.*, 2009). El mecanismo a través del cual estas proteínas catalizan el apareamiento no está aún muy claro. La proteína RecT parece utilizar una estrategia parecida a la de RecA y Rad51 dando lugar a un superenrollamiento positivo del DNA (Noirot, *et al.*, 2003).

Ha sido propuesto, por alineamiento de secuencia basado en la comparación de predicciones de la estructura secundaria de proteínas de diferentes fagos (RecT, Red β , G35P...) y de muchas bacterias Gram positivas (*Bacillus*, *Streptococcus*, *Listeria*), que existe una estructura común para las proteínas que pertenecen a la familia RecT. El estudio predice que pueden existir 5 hélices α y que 3 de ellas podrían estar implicadas en la interacción proteína-proteína y proteína-DNA por la presencia de aminoácidos polares (en particular, las hélices 2, 3 y 4). En el resto de la secuencia se encuentran aminoácidos con carácter hidrófobo que probablemente se requieren para que las proteínas puedan mantener su forma globular. Finalmente, el estudio contempla la posibilidad de que dos residuos ácidos (D247 y E248 en G35P), altamente conservados en el dominio C-terminal, coordinen el Mg^{2+} , que se sabe que está implicado en la actividad de anillamiento de cadenas (Ayora, *et al.*, 2002, Iyer, *et al.*, 2002).

En este trabajo se construyeron mutantes puntuales de la proteína G35P, sustituyendo con alanina tres aminoácidos polares: S76, R127 y K224 que se encuentran, respectivamente, en la hélice 2, 3 y 4. Además se mutó uno de los aminoácidos del dominio C-terminal (E248) que podría estar implicado en la coordinación de Mg^{2+} . Según el alineamiento propuesto en el trabajo de Datta y colaboradores, todos los aminoácidos mutados en este trabajo están altamente conservados en RecT, pero solo los aminoácidos S76 y R127 están conservados en Red β . En el anillamiento, en la posición del aminoácido polar con carga positiva K224 de G35P se encuentra en Red β un residuo polar de asparagina, mientras en la posición del residuo con carga negativa E248 de G35P en Red β se halla un residuo apolar de leucina, al que sigue un residuo de aspártico altamente conservado.

Mediante análisis de complementación *in vivo* se demostró que los mutantes S76A, R127A y K224A no complementan la función de la proteína G35P silvestre. A cambio, el mutante E248A produce solo una atenuación de la función (**Tabla 8**).

El análisis bioquímico ha revelado que las mutaciones puntuales introducidas en la proteína G35P varían la capacidad de unión de las proteínas a DNA de cadena sencilla y DNA de cadena doble. La mutación en el aminoácido K224 destruye la capacidad de unión a DNA de cadena sencilla y a DNA de cadena doble, siendo su K_{app} , en las condiciones probadas, respectivamente, mayor de 1 μ M y 500 nM. El mutante R127A

muestra una afinidad menor por el DNA de cadena sencilla tanto en presencia de Mg^{2+} , como en presencia de EDTA, y también resulta afectada la capacidad de unión a DNA de cadena doble (con una $K_{app} > 250$ nM). Esto indicaría que, como en caso de Red β , aminoácidos polares cargados positivamente están involucrados en la unión de la proteína al DNA (Wu, *et al.*, 2006).

En nuestros ensayos, el mutante S76A mostró una capacidad de unión a DNA de cadena sencilla parecida a la proteína silvestre, pero su capacidad de unión a DNA de doble cadena resultó algo afectada (con una $K_{app} > 250$ nM).

El mutante E248A muestra con el DNA de cadena sencilla y en presencia de Mg^{2+} , una mayor afinidad por el sustrato frente a la proteína silvestre. Además, este tiene más afinidad por el DNA de cadena doble (con una $K_{app} \cong 100$ nM) y acelera la reacción de anillamiento entre cadenas complementarias con mayor eficiencia que la proteína silvestre. Estos resultados concuerdan con los ensayos de complementación *in vivo* donde se observó que la variante E248A complementa parcialmente la función de G35P (**Tabla 8**). Se ha observado que las condiciones mediante las cuales las proteínas catalizan la reacción de invasión de cadena entre un oligonucleótido y un DNA plasmídico superenrollado pueden ser diferentes, aun perteneciendo a la misma familia (Ayora, *et al.*, 2002). Existen proteínas como por ejemplo RecT, que no requieren magnesio y proteínas como G35P y Rad51 que requieren diferentes concentraciones de magnesio para catalizar la formación de un bucle-D. Las diferencias que presentan estas proteínas en cuanto a las concentraciones de magnesio necesarias para la reacción se podrían correlacionar con su unión preferencial a DNAd o DNAs, y sugieren que estas proteínas pueden tener mecanismos de acción diferentes. Muchas proteínas de esta familia como RecT (Noirot & Kolodner, 1998) y Rad52 (Kagawa, *et al.*, 2001) unen preferentemente a DNA de doble cadena en concentraciones de magnesio bajas o nulas, y requieren estas concentraciones para formar un bucle-D. G35P cataliza la formación de bucles-D a altas concentraciones de magnesio, cuando su afinidad para el DNA de doble cadena es tres veces menor en presencia de magnesio que en su ausencia (Ayora, *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos con el mutante E248A indicarían que este residuo no está involucrado en la coordinación de magnesio, esencial para la reacción de anillamiento.

El análisis bioquímico ha revelado que el mutante R127A une DNA de cadena doble con menos afinidad ($K_{app} > 250$ nM) que la proteína silvestre y disminuye la eficiencia de anillamiento de la proteína (**Figura 38**). Este resultado sugiere que la unión a DNA de doble cadena podría influir sobre la actividad de anillamiento del DNA de cadena sencilla, aunque aún se desconoce con qué mecanismo. Si bien en el anillamiento de secuencia el aminoácido R127 no tiene correspondencia con el residuo R161 de Red β , los

resultados parecen indicar que en G35P este aminoácido cargado positivamente podría tener un papel importante en la actividad de la proteína.

5.3.3 La interacción entre la proteína G35P y la proteína G36P

Se había demostrado anteriormente que la proteína G36P interacciona con la proteína recombinasa G35P (Ayora, *et al.*, 2002) y en este trabajo, mediante precipitación con sulfato amónico, se ha comprobado esta interacción (**Figura 31**). Además, analizando los mutantes de G36P y de G35P se ha demostrado que estas dos proteínas no interaccionan a través del dominio C-terminal de G36P (**Figura 32**), y que los mutantes puntuales que llevan, según la estructura propuesta para RecT, la mutación en las hélices 3 y 4 (R127A y K224) siguen interaccionando con la proteína de unión a cadena sencilla. Sin embargo, la mutación S76A situada en la supuesta hélice 2 destruye la interacción con G36P (**Figura 39**).

En la replicación del bacteriófago SPP1 se propone que en el cambio de replicación de tipo θ a tipo σ se forma un intermedio de replicación que tras su resolución, podría ser atacado por la exonucleasa G34.IP, dando lugar a un DNA de cadena sencilla donde la recombinasa G35P podría filantar y catalizar una reacción de invasión de cadena en un DNA homólogo (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2005). Sin embargo, la proteína G36P presenta una afinidad por el DNA de cadena sencilla muy alta, y nuestros resultados de la **Figura 40** muestran que la recombinasa no es capaz de desplazarla. Es posible que cuando G34.IP comienza a degradar el DNA de cadena doble, en el producto de cadena sencilla se sitúe la proteína G35P, que a diferencia de G36P, puede unir DNAs de longitudes inferiores a 41-nt (M. Martinez Jimenez, resultados no publicados). En tal caso la proteína G35P ya situada, podría empezar a filantar sin competir con G36P. En otros sistemas se ha descrito que exonucleasas 5'-3', como por ejemplo RecE y Red α , digieren el DNA de doble cadena dejando una cola 3' en la cual las proteínas recombinasa RecT y Red β , con las cuales interaccionan respectivamente, pueden filantar (Muyrers, *et al.*, 2000, Vellani & Myers, 2003, Martinez-Jimenez, *et al.*, 2005). Debido a la baja solubilidad de la proteína G34.IP no se pudo analizar su posible interacción con G35P.

En el caso que la proteína G36P esté unida al DNA, ha de abandonar el sustrato para permitir que G35P filante en el DNAs y promueva el intercambio de cadenas. En este caso, G36P al proteger el DNA de cadena sencilla podría redirigir la actividad de G34.IP hacia sustratos de DNA de cadena doble que dejen una cola 3' para que G35P filante.

Los resultados obtenidos *in vitro* indican que G36P facilita la unión de G35P a DNA de cadena sencilla cuando se añade a la reacción después de la recombinasa (**Figura 40**). Sin embargo, las dos proteínas no se acomodan juntas en la misma molécula de DNA (**Figura 42**). Este resultado implicaría que las proteínas forman con el DNA dos complejos independientes y que G36P, probablemente ayuda el cargado de G35P resolviendo en las moléculas de DNA de cadena sencilla las estructuras secundarias que pueden generarse.

El complicado mecanismo a través del cual las recombinasas (como por ejemplo: UvsX, RecA, Rada, Rad51, Dmc1) se cargan sobre un sustrato de DNA de cadena sencilla cubierto de proteínas tipo SSB (como gp32, SSB/SsbA, RPA) se conoce con detalle únicamente en algunos sistemas (Beernink & Morrical, 1999, Sung, *et al.*, 2003, Cox, 2007) donde se han descrito proteínas mediadoras que pueden facilitar la unión de la recombinasa al DNA de cadena sencilla al interaccionar y desplazar del DNAs a la proteína tipo SSB. Es el caso de UvsY, en el fago T4, de RecOR/RecO, en bacterias y de Rad52 en eucariotas (Beernink & Morrical, 1999, Sung, *et al.*, 2003, Cox, 2007, Manfredi, *et al.*, 2008). En el caso de SPP1, actualmente no se conoce ningún mediador.

En este trabajo se ha demostrado que la proteína G36P, aunque tenga una afinidad por el DNA de cadena sencilla muy alta ($K_{app} = 0,2 \pm 0,2$ nM), y a diferencia de otras proteína tipo SSBs (Yadav, *et al.*, 2012), forma con un sustrato de 80-nt un complejo que se mantiene solo en el orden del 20% tras la adición de un DNA competidor. La baja estabilidad del complejo DNA-proteína podría por lo tanto conllevar al desplazamiento de G36P hacia otro sustrato favoreciendo la unión de G35P al DNA. Sin embargo, en ensayos de competición se ha observado que la proteína G35P no es capaz de desplazar la proteína G36P de un DNA de 114-nt con el cual se incubó previamente, por lo tanto, es probable que la proteína G36P forme complejos más estables con DNAs de longitud mayor a 80-nt (M. Martinez Jimenez, resultados no publicados). Esta hipótesis también puede ser avalada por el resultado obtenido en la reacción de anillamiento en la **Figura 43**, donde se observa que G36P inhibe la reacción de anillamiento de cadenas complementarias catalizada por G35P, si se añade a la reacción antes que G35P. En la reacción se consideró que al igual que SSB, G36P cubre con un homotetrámero alrededor de 60 nucleótidos de un DNA de cadena sencilla, por lo tanto para cubrir totalmente el DNA se requiere 6 nM de G36P. Aún a concentraciones no saturantes de G36P, G35P no es capaz de desplazar a la proteína de unión a cadena sencilla del DNA. Por tanto no se descarta que para desplazar la proteína G36P del DNA *in vivo*, la proteína G35P necesite un mediador actualmente no identificado.

Se sabe que la proteína G36P estimula la actividad de intercambio de cadena de la recombinasa G35P, en presencia de la proteína G34.1P (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2005) y en esta tesis se demostró que la proteína de unión a cadena sencilla no es capaz de incrementar el anillamiento de cadenas complementarias catalizado por la proteína G35P. Además, los resultados indican que cuando a la reacción se añade primero la proteína G36P, la proteína G35P no es capaz de desplazar a la proteína de unión a cadena sencilla (**Figura 43**) y se inhibe por completo el anillamiento de DNA. Por lo tanto los resultados anteriormente publicados podrían revelar que G34.1P tiene un papel como mediador y que podría ayudar a G35P a desplazar a la proteína G36P del DNA de cadena sencilla. Otra posibilidad es que la proteína mediadora sea G38P. Los resultados presentados indican que esta proteína interacciona débilmente con G36P (**Figura 25**) y los datos obtenidos *in vivo* sugieren que podría existir una interacción con G35P. Además se ha observado en el sistema de replicación *in vitro* que altas concentraciones de la proteína G36P (270 nM) inhiben la replicación de la cadena retrasada (**Figura 29**), sin embargo resultados no publicados indican que los niveles normales de replicación se recuperan cuando a la reacción se añaden concentraciones crecientes de G38P (Elena Seco, comunicación personal). Por lo tanto no se descarta que *in vivo* la proteína G38P pueda desplazar la proteína G36P del DNA de cadena sencilla y favorecer el cargado de G35P.

En otros sistemas se conocen proteínas mediadoras que promueven la unión de las recombinasas a DNAs de cadena sencilla. En el bacteriófago T4 la proteína UvsY ayuda a la recombinasa UvsX a desplazar a la proteína de unión a cadena sencilla gp32 del DNAs. (Pant, *et al.*, 2008). UvsY es capaz de unir DNAd y DNAs (Xu, *et al.*, 2010) y se ha descrito que interacciona con gp32, con UvsX, y con el complejo ATPasa/exonucleasa gp46/gp47 (Bleuit, *et al.*, 2001). En el fago λ la proteína Orf complementa la función del sistema mediador RecFOR de *E. coli in vivo* (Sawitzke & Stahl, 1992), y favorece la filamentación de la proteína RecA bacteriana sobre un DNA de cadena sencilla revestido con SSB. Orf interacciona con la proteína SSB de *E. coli* (Curtis, *et al.*, 2011), sin embargo, aún no se ha demostrado si Orf desempeña algún papel en la modulación de la proteínas Red α -Red β . En bacterias también se ha observado que el complejo mediador RecO/RecOR ayuda a la proteína RecA a superar el efecto inhibitor ejercido por SsbA (Ayora, *et al.*, 2011).

5.3.4 La proteína G44P

Cuando se publicó la secuencia completa del genoma de SPP1, se asignó una función a la mayoría de los 53 genes predichos (Alonso, *et al.*, 1997). Sin embargo, la función de algunos ORFs quedaba aún desconocida. Se encontró que uno de los genes con función desconocida, el gen 45 parecía ser una proteína tipo RusA pero truncada. El gen 45 codifica por una proteína de sólo 59 aminoácidos que parece haber perdido el dominio N-terminal de proteínas tipo RusA (Bolt, *et al.*, 2000). Después de haber demostrado que existía un error en la secuencia publicada (**Figura 44**), hemos mostrado que SPP1 codifica un polipéptido de 27,5 kDa que se nombró G44P.

Como RusA de *E. coli*, G44P es una resolvasa, que en solución forma un dímero, y que es capaz de unir y cortar intermedios de replicación en presencia de Mg^{2+} . A diferencia de la proteína RusA de *E. coli* que une DNA de cadena sencilla con más afinidad que el DNA de cadena doble (Chan, *et al.*, 1998), la proteína G44P une débilmente DNA de cadena sencilla y su capacidad de unión a DNA de doble cadena es 5-10 veces menor comparando con la capacidad de unión a estructuras ramificadas (**Figura 46**).

En este trabajo, se analizó la especificidad de corte de la proteína G44P. Mientras la proteína RusA de *E. coli* corta específicamente estructuras de Holliday, preferentemente en el punto de intersección de las ramas el dinucleótido CC en 5' (Chai, *et al.*, 1993, Chan, *et al.*, 1998, Macmaster, *et al.*, 2006), la proteína G44P corta tanto estructuras de Holliday, como bucles-D procesados, en ambos casos con una especificidad de secuencia no muy estricta. Además a diferencia de RusA de *E. coli* que no corta estructuras de Holliday estáticas, se observó que G44P corta de forma simétrica y eficientemente las estructuras de Holliday móviles probadas (HJ-23M en **Figura 47**). Queda por determinar a qué se deben estas diferencias entre ambas resolvasas. La proteína G44P es más grande que otras proteínas tipo RusA identificadas hasta el momento (Pfam 05866). RusA de *E. coli* es una proteína pequeña, formada por dos monómeros de 14 kDa. A cambio, la proteína G44P, que también es un dímero en solución, contiene una región adicional de 13 kDa en la región N-terminal, cuyo papel sigue siendo desconocido. Se postula que este dominio N-terminal pueda determinar algunas de las diferencias observadas en este trabajo.

5.4 El modelo de inicio de la replicación concatémica

El bacteriófago SPP1 es uno de los virus más estudiados del filo de los Firmicutes. Una de las características más interesantes de este fago es su proceso de replicación. Teniendo en cuenta la bibliografía citada y los datos obtenidos *in vivo* y *in vitro* en este trabajo se propone un modelo para explicar el mecanismo de inicio de la replicación concatémica (**Figura 49**).

1. El fago posee dos orígenes de replicación *oriL* y *oriR*, que se encuentran a una distancia de 12 kb (Missich, *et al.*, 1997). La replicación empieza mediante un mecanismo θ desde *oriL* o desde *oriR*.
2. Tras una o más rondas de replicación, la proteína G38P, fuertemente unida, o bien a *oriR*, o bien a *oriL*, bloquea la progresión de la horquilla de replicación procedente del otro origen y la invierte, quedando anilladas las cadenas recién replicadas de las hebras líder y retrasada, formando, de tal manera, una estructura de Holliday (Seigneur, *et al.*, 1998). La replicación tipo θ por lo tanto queda bloqueada (Alonso JC, 2006) (Etapas 1-2 A de la **Figura 49**).
3. Tras la parada de la horquilla de replicación de DNA, la replicación se reanuda a través de procesos de recombinación homóloga.
4. La resolución de la estructura de Holliday podría ser llevada a cabo por la resolvasa G44P que generaría un DNA de doble cadena con un extremo libre (Helleday, *et al.*, 2007). En éste actuaría la proteína exonucleasa G34.1P, degradando una hebra del DNA en dirección 5'-3' (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2005) y dejando libre en la cadena complementaria el extremo 3'OH donde la proteína G35P puede filamentar (Etapas 3-5 A de la **Figura 49**).
5. La recombinasa G35P filaminta en este intermedio y promueve la invasión de cadena en otra molécula de DNA superenrollado de SPP1, llevando a la formación de un bucle-D, tal como se ha comprobado *in vitro* (Ayora, *et al.*, 2002).
6. En este bucle-D, debido a la interacción de la proteína G35P con G36P y G40P se carga el nuevo replisoma. Además, la proteína G36P podría reclutar nuevamente la proteína G38P que según ensayos *in vitro* se requiere para el correcto cargado de la helicasa G40P (Seco, *et al.*, 2013). La proteína τ del huésped podría ser reclutada o bien a través de la interacción con G36P, o bien a través de la interacción con G40P (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2002). Una vez reclutadas las

proteínas de SPP1 y las proteínas del huésped necesarias, se empieza la síntesis de la cadena líder y de la cadena desplazada.

Como ya describimos en la introducción, se propusieron dos modelos para generar DNA concatémico desde un bucle-D en SPP1. En el primer modelo (en la **Figura 49**, 1B), una vez restablecida la replicación en el bucle-D, creemos que la proteína G44P podría cortar específicamente la estructura bucle D-replicada (Martinez-Jimenez, *et al.*, 2005, Zecchi, *et al.*, 2012) La síntesis de DNA concatémico se reanudaría mediante un mecanismo de replicación semiconservativo a partir del extremo 3'-OH generado, de forma similar al mecanismo de círculo rodante utilizado por algunos plásmidos (Khan, 2005).

En el segundo modelo propuesto (**Figura 49** 1B'), una vez restablecida la replicación como se indica anteriormente, debido a la extrusión del DNA de nueva síntesis y por migración de la burbuja de replicación, la síntesis de DNA seguiría con un mecanismo de replicación conservativo dando lugar a un DNA concatémico (Formosa & Alberts, 1986). Según este modelo por lo tanto, la acción de la proteína G44P no se precisaría en esta segunda etapa.

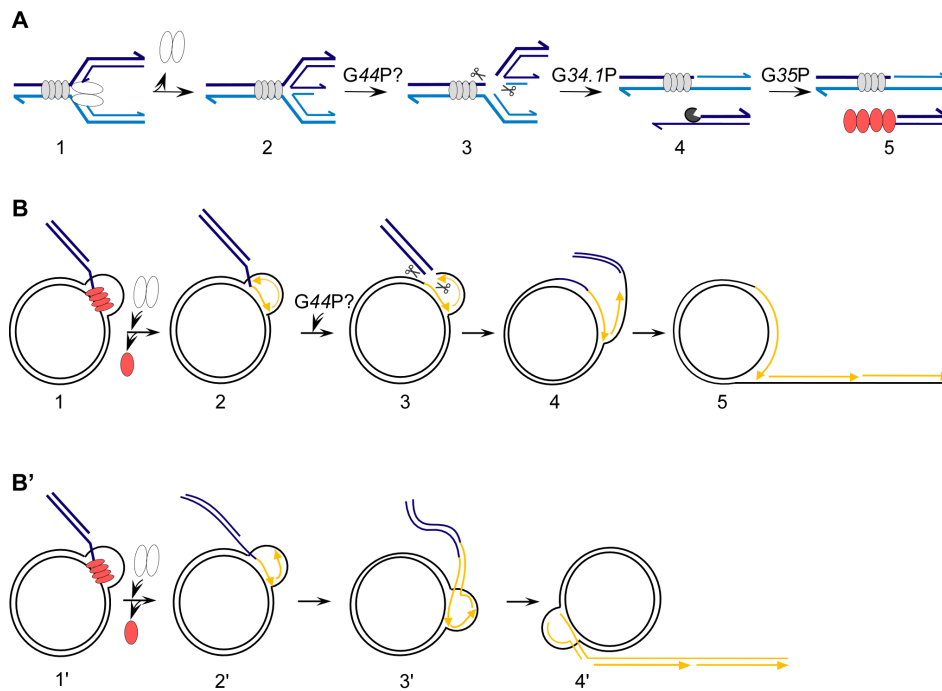


Figura 49. Modelos de iniciación de la replicación concatemérica en SPP1. **A** G38P produce una parada de la horquilla de replicación y la generación de roturas de doble cadena. 1, G38P (óvalos grises) unida a una región *ori* detiene la progresión del replisoma (óvalos blancos). 2, Regresión de la horquilla de replicación y formación de una estructura de Holliday. 3, La endonucleasa G44P (tijeras) podría cortar la estructura de Holliday dando lugar a una rotura del DNA de doble cadena. 4, La exonucleasa 3'-5' G34.1P (comecocos) procesa el extremo. 5, La recombinasa G35P (óvalos rojos) filaminta sobre el extremo 3' de DNA de cadena sencilla (el extremo 3' se indica con una flecha). A partir de este sustrato se sugieren dos modelos de iniciación de la replicación concatemérica. **B**. Modelo de iniciación de la replicación concatemérica tipo σ . 1, La recombinasa G35P promueve la invasión de cadena en una molécula de SPP1. 2, Se recluta el replisoma y el extremo 3' de la cadena invasora se utiliza como cebador para la síntesis del DNA. G35P abandona el sustrato. 3, G44P podría cortar el bucle D replicado. 4 y 5, La reorganización de las cadenas y sellado por ligasa podrían generar el sustrato apropiado para una replicación concatemérica, tipo σ , mediante un mecanismo semiconservativo. **B'**. Modelo de iniciación de la replicación concatemérica por migración de burbuja. Los pasos 1' y 2' son comunes en ambos modelos. 3' y 4', La migración de la burbuja de replicación y la extrusión del DNA de nueva síntesis permiten que la replicación del DNA se lleve a cabo con un mecanismo conservativo, sin necesidad que una endonucleasa específica catalice un corte en la estructura bucle-D. En B y en B' el molde de DNA se muestra en negro, y el DNA de nueva síntesis en amarillo

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. La proteína G38P une los dos orígenes de replicación *oriL* y *oriR* y los aparea. G38P podría ser responsable del inicio de la replicación y de su regulación.
2. La región *oriR* es un origen de replicación *in vivo*. La replicación dependiente de recombinación puede comenzar a partir *oriL* o a partir de *oriR* si existe previamente una parada de la replicación. A continuación la proteína G35P, probablemente mediante la interacción con G38P cataliza la invasión de cadena del DNA promoviendo el cambio de replicación de tipo θ a tipo σ . Las proteínas G35P y G38P son esenciales para la replicación dependiente de recombinación del DNA.
3. La replicación concatemérica puede dispararse tras una rotura de la doble cadena, en ausencia de un origen de replicación propio del fago.
4. El dominio C-terminal de la proteína G36P confiere estabilidad al complejo DNAs-proteína y, en un sistema de replicación *in vitro*, se requiere para que la horquilla de replicación progrese; sin embargo no es esencial, ni para la tetramerización de la proteína, ni para la unión de la proteína al DNA.
5. La proteína G36P interacciona fuertemente con la helicasa replicativa G40P, con la recombinasa G35P y con la subunidad τ del holoenzima polimerasa y estas interacciones no se dan a través del dominio C-terminal de la proteína de unión cadena sencilla. Existe una débil interacción entre G36P y G38P, que podría darse por el dominio C-terminal de G36P, y una interacción entre G36P y la resolvasa G44P.
6. La mutación S76A de la proteína G35P destruye la interacción de la recombinasa con la proteína G36P. La arginina 127 de G35P está involucrada en la unión de DNA de cadena doble y en el anillamiento de DNA. El residuo lisina 224 de G35P es esencial para la unión a DNA de cadena doble y de cadena sencilla.

7. La proteína G36P facilita el cargado de G35P resolviendo en las moléculas de DNA de cadena sencilla la estructuras secundarias que pueden generarse, pero G35P no es capaz de desplazar a G36P del DNA de cadena sencilla y requiere probablemente un mediador.
8. La proteína G44P es un polipéptido de 27,5 kDa que se presenta como un dímero en solución.
9. La proteína G44P une preferentemente y corta, en presencia de Mg^{2+} , tanto estructuras de Holliday como bucles-D procesados con una especificidad de secuencia no muy estricta.
10. En el mecanismo de cambio de replicación de tipo θ a tipo σ se propone la formación de una estructura de Holliday, cuya resolución podría ser llevada a cabo por la resolvasa G44P. En el DNA lineal generado actuarían las proteínas G34.1P y G35P, que llevarían a la formación de un bucle-D donde el replisoma se ensamblaría de nuevo.

7. BIBLIOGRAFIA

- Allen GC, Jr. & Kornberg A (1993) Assembly of the primosome of DNA replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**: 19204-19209.
- Alonso JC, Luder G & Trautner TA (1986) Requirements for the formation of plasmid-transducing particles of *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1. *EMBO J* **5**: 3723-3728.
- Alonso JC, Luder G, Stiege AC, Chai S, Weise F & Trautner TA (1997) The complete nucleotide sequence and functional organization of *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1. *Gene* **204**: 201-212.
- Alonso JC TP, Lurz R, Trautner TA (2006) Bacteriophage SPP1. *Oxford University Press* 331-349.
- Arai K & Kornberg A (1981) Mechanism of dnaB protein action. II. ATP hydrolysis by dnaB protein dependent on single- or double-stranded DNA. *J Biol Chem* **256**: 5253-5259.
- Arai K, Low RL & Kornberg A (1981) Movement and site selection for priming by the primosome in phage phi X174 DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 707-711.
- Ayora S, Langer U & Alonso JC (1998) *Bacillus subtilis* DnaG primase stabilises the bacteriophage SPP1 G40P helicase-ssDNA complex. *FEBS Lett* **439**: 59-62.
- Ayora S, Stasiak A & Alonso JC (1999) The *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 G39P delivers and activates the G40P DNA helicase upon interacting with the G38P-bound replication origin. *J Mol Biol* **288**: 71-85.
- Ayora S, Weise F, Mesa P, Stasiak A & Alonso JC (2002) *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 hexameric DNA helicase, G40P, interacts with forked DNA. *Nucleic Acids Res* **30**: 2280-2289.
- Ayora S, Carrasco B, Doncel-Perez E, Lurz R & Alonso JC (2004) *Bacillus subtilis* RecU protein cleaves Holliday junctions and anneals single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 452-457.
- Ayora S, Missich R, Mesa P, Lurz R, Yang S, Egelman EH & Alonso JC (2002) Homologous-pairing activity of the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 replication protein G35P. *J Biol Chem* **277**: 35969-35979.
- Ayora S, Carrasco B, Cardenas PP, *et al.* (2011) Double-strand break repair in bacteria: a view from *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 1055-1081.
- Barcena M, Martin CS, Weise F, Ayora S, Alonso JC & Carazo JM (1998) Polymorphic quaternary organization of the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 replicative helicase (G40 P). *J Mol Biol* **283**: 809-819.
- Barnes MH, Tarantino PM, Jr., Spacciapoli P, Brown NC, Yu H & Dybvig K (1994) DNA polymerase III of *Mycoplasma pulmonis*: isolation and characterization of the enzyme and its structural gene, polC. *Mol Microbiol* **13**: 843-854.
- Bastia D & Sueoka N (1975) Studies on the late replication of phage lambda: rolling-circle replication of the wild type and a partially suppressed strain, Oam29 Pam80. *J Mol Biol* **98**: 305-320.
- Becker B, de la Fuente N, Gassel M, *et al.* (1997) Head morphogenesis genes of the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1. *J Mol Biol* **268**: 822-839.
- Beernink HT & Morrical SW (1999) RMPs: recombination/replication mediator proteins. *Trends Biochem Sci* **24**: 385-389.
- Bendtsen JD, Nilsson AS & Lehnher H (2002) Phylogenetic and functional analysis of the bacteriophage P1 single-stranded DNA-binding protein. *J Virol* **76**: 9695-9701.
- Better M & Freifelder D (1983) Studies on the replication of *Escherichia coli* phage lambda DNA. I. The kinetics of DNA replication and requirements for the generation of rolling circles. *Virology* **126**: 168-182.

Birkenkamp-Demtroder K, Golz S & Kemper B (1997) Inhibition of Holliday structure resolving endonuclease VII of bacteriophage T4 by recombination enzymes UvsX and UvsY. *J Mol Biol* **267**: 150-162.

Birnboim HC & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.

Bleuit JS, Xu H, Ma Y, Wang T, Liu J & Morrical SW (2001) Mediator proteins orchestrate enzyme-ssDNA assembly during T4 recombination-dependent DNA replication and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8298-8305.

Bolt EL, Sharples GJ & Lloyd RG (1999) Identification of three aspartic acid residues essential for catalysis by the RusA holliday junction resolvase. *J Mol Biol* **286**: 403-415.

Bolt EL, Sharples GJ & Lloyd RG (2000) Analysis of conserved basic residues associated with DNA binding (Arg69) and catalysis (Lys76) by the RusA holliday junction resolvase. *J Mol Biol* **304**: 165-176.

Bortner C, Hernandez TR, Lehman IR & Griffith J (1993) Herpes simplex virus 1 single-strand DNA-binding protein (ICP8) will promote homologous pairing and strand transfer. *J Mol Biol* **231**: 241-250.

Bott KF & Wilson GA (1968) Metabolic and nutritional factors influencing the development of competence for transfection of *Bacillus subtilis*. *Bacteriol Rev* **32**: 370-378.

Bramhill D & Kornberg A (1988) A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* **54**: 915-918.

Bravo A & Alonso JC (1990) The generation of concatemeric plasmid DNA in *Bacillus subtilis* as a consequence of bacteriophage SPP1 infection. *Nucleic Acids Res* **18**: 4651-4657.

Brill SJ & Stillman B (1991) Replication factor-A from *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by three essential genes coordinately expressed at S phase. *Genes Dev* **5**: 1589-1600.

Bruand C, Velten M, McGovern S, Marsin S, Serena C, Ehrlich SD & Polard P (2005) Functional interplay between the *Bacillus subtilis* DnaD and DnaB proteins essential for initiation and re-initiation of DNA replication. *Mol Microbiol* **55**: 1138-1150.

Bruck I & O'Donnell M (2000) The DNA replication machine of a gram-positive organism. *J Biol Chem* **275**: 28971-28983.

Bruck I, Georgescu RE & O'Donnell M (2005) Conserved interactions in the *Staphylococcus aureus* DNA PolC chromosome replication machine. *J Biol Chem* **280**: 18152-18162.

Bujalowski W & Lohman TM (1986) *Escherichia coli* single-strand binding protein forms multiple, distinct complexes with single-stranded DNA. *Biochemistry* **25**: 7799-7802.

Burger KJ & Trautner TA (1978) Specific labelling of replicating SPP1 DNA: analysis of viral DNA synthesis and identification of phage DNA-genes. *Mol Gen Genet* **166**: 277-285.

Buss JA, Kimura Y & Bianco PR (2008) RecG interacts directly with SSB: implications for stalled replication fork regression. *Nucleic Acids Res* **36**: 7029-7042.

Cadman CJ & McGlynn P (2004) PriA helicase and SSB interact physically and functionally. *Nucleic Acids Res* **32**: 6378-6387.

Camacho AG, Gual A, Lurz R, Tavares P & Alonso JC (2003) *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 DNA packaging motor requires terminase and portal proteins. *J Biol Chem* **278**: 23251-23259.

Casas-Finet JR, Khamis MI, Maki AH & Chase JW (1987) Tryptophan 54 and phenylalanine 60 are involved synergistically in the binding of *E. coli* SSB protein to single-stranded polynucleotides. *FEBS Lett* **220**: 347-352.

Ceglowski P, Lurz R & Alonso JC (1993) Functional analysis of pSM19035-derived replicons in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* **109**: 145-150.

Chai S, Szepan U, Luder G, Trautner TA & Alonso JC (1993) Sequence analysis of the left end of the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 genome. *Gene* **129**: 41-49.

- Chai S, Bravo A, Luder G, Nedlin A, Trautner TA & Alonso JC (1992) Molecular analysis of the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 region encompassing genes 1 to 6. The products of gene 1 and gene 2 are required for pac cleavage. *J Mol Biol* **224**: 87-102.
- Chan SN, Vincent SD & Lloyd RG (1998) Recognition and manipulation of branched DNA by the RusA Holliday junction resolvase of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **26**: 1560-1566.
- Chan SN, Harris L, Bolt EL, Whitby MC & Lloyd RG (1997) Sequence specificity and biochemical characterization of the RusA Holliday junction resolvase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**: 14873-14882.
- Chase JW & Williams KR (1986) Single-stranded DNA binding proteins required for DNA replication. *Annu Rev Biochem* **55**: 103-136.
- Chintakayala K, Machon C, Haroniti A, Larson MA, Hinrichs SH, Griep MA & Soultanas P (2009) Allosteric regulation of the primase (DnaG) activity by the clamp-loader (tau) in vitro. *Mol Microbiol* **72**: 537-549.
- Chung YB, Nardone C & Hinkle DC (1990) Bacteriophage T7 DNA packaging. III. A "hairpin" end formed on T7 concatemers may be an intermediate in the processing reaction. *J Mol Biol* **216**: 939-948.
- Costes A, Lecointe F, McGovern S, Quevillon-Cheruel S & Polard P The C-terminal domain of the bacterial SSB protein acts as a DNA maintenance hub at active chromosome replication forks. *PLoS Genet* **6**: e1001238.
- Costes A, Lecointe F, McGovern S, Quevillon-Cheruel S & Polard P (2010) The C-terminal domain of the bacterial SSB protein acts as a DNA maintenance hub at active chromosome replication forks. *PLoS Genet* **6**: e1001238.
- Cox MM (2007) Regulation of bacterial RecA protein function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**: 41-63.
- Cox MM, Goodman MF, Kreuzer KN, Sherratt DJ, Sandler SJ & Mariani KJ (2000) The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* **404**: 37-41.
- Curth U, Genschel J, Urbanke C & Greipel J (1996) In vitro and in vivo function of the C-terminus of *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein. *Nucleic Acids Res* **24**: 2706-2711.
- Curtis FA, Reed P, Wilson LA, *et al.* (2011) The C-terminus of the phage lambda Orf recombinase is involved in DNA binding. *J Mol Recognit* **24**: 333-340.
- Dabrowski S, Olszewski M, Piatek R, Brillowska-Dabrowska A, Konopa G & Kur J (2002) Identification and characterization of single-stranded-DNA-binding proteins from *Thermus thermophilus* and *Thermus aquaticus* - new arrangement of binding domains. *Microbiology* **148**: 3307-3315.
- Dallmann HG & McHenry CS (1995) DnaX complex of *Escherichia coli* DNA polymerase III holoenzyme. Physical characterization of the DnaX subunits and complexes. *J Biol Chem* **270**: 29563-29569.
- Dallmann HG, Kim S, Pritchard AE, Mariani KJ & McHenry CS (2000) Characterization of the unique C terminus of the *Escherichia coli* tau DnaX protein. Monomeric C-tau binds alpha AND DnaB and can partially replace tau in reconstituted replication forks. *J Biol Chem* **275**: 15512-15519.
- Datta S, Costantino N, Zhou X & Court DL (2008) Identification and analysis of recombineering functions from Gram-negative and Gram-positive bacteria and their phages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 1626-1631.
- Davey MJ & O'Donnell M (2003) Replicative helicase loaders: ring breakers and ring makers. *Curr Biol* **13**: R594-596.
- de la Hoz AB, Ayora S, Sitkiewicz I, Fernandez S, Pankiewicz R, Alonso JC & Ceglowski P (2000) Plasmid copy-number control and better-than-random segregation genes of pSM19035 share a common regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 728-733.

Declais AC & Lilley DM (2008) New insight into the recognition of branched DNA structure by junction-resolving enzymes. *Curr Opin Struct Biol* **18**: 86-95.

Deichelbohrer I, Alonso JC, Luder G & Trautner TA (1985) Plasmid transduction by *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1: effects of DNA homology between plasmid and bacteriophage. *J Bacteriol* **162**: 1238-1243.

Dervyn E, Suski C, Daniel R, *et al.* (2001) Two essential DNA polymerases at the bacterial replication fork. *Science* **294**: 1716-1719.

Dixit A, Ray K, Lakowicz JR & Black LW (2011) Dynamics of the T4 bacteriophage DNA packasome motor: endonuclease VII resolvase release of arrested Y-DNA substrates. *J Biol Chem* **286**: 18878-18889.

Dodson MG, Young RL, Poindexter AN, Findley WE, Rossavick I, Lipschultz LI & Gibbons WE (1986) A detailed program review of in vitro fertilization with a discussion and comparison of alternative approaches. *Surg Gynecol Obstet* **162**: 89-104.

Droge A & Tavares P (2000) In vitro packaging of DNA of the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1. *J Mol Biol* **296**: 103-115.

Eggington JM, Haruta N, Wood EA & Cox MM (2004) The single-stranded DNA-binding protein of *Deinococcus radiodurans*. *BMC Microbiol* **4**: 2.

Erler A, Wegmann S, Elie-Caille C, *et al.* (2009) Conformational adaptability of Redbeta during DNA annealing and implications for its structural relationship with Rad52. *J Mol Biol* **391**: 586-598.

Esche H (1975) Gene expression of bacteriophage SPP1. II. Regulatory aspects. *Mol Gen Genet* **142**: 57-66.

Fang L, Davey MJ & O'Donnell M (1999) Replisome assembly at *oriC*, the replication origin of *E. coli*, reveals an explanation for initiation sites outside an origin. *Mol Cell* **4**: 541-553.

Fass D, Bogden CE & Berger JM (1999) Crystal structure of the N-terminal domain of the DnaB hexameric helicase. *Structure* **7**: 691-698.

Flett F, de Mello Jungmann-Campello D, Mersinias V, Koh SL, Godden R & Smith CP (1999) A 'gram-negative-type' DNA polymerase III is essential for replication of the linear chromosome of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **31**: 949-958.

Formosa T & Alberts BM (1986) DNA synthesis dependent on genetic recombination: characterization of a reaction catalyzed by purified bacteriophage T4 proteins. *Cell* **47**: 793-806.

Friedberg EC, Lehmann AR & Fuchs RP (2005) Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol Cell* **18**: 499-505.

Fukuoka T, Moriya S, Yoshikawa H & Ogasawara N (1990) Purification and characterization of an initiation protein for chromosomal replication, DnaA, in *Bacillus subtilis*. *J Biochem* **107**: 732-739.

Fuller RS, Funnell BE & Kornberg A (1984) The *dnaA* protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (*oriC*) and other DNA sites. *Cell* **38**: 889-900.

Ganesan AT, J. J. Andersen, J. Luh, and M. Effron (1976) DNA metabolism, in *Bacillus subtilis* and its phage SPP1. In *Schlessinger, D Microbiology* **1976**: 319-325.

Golz S & Kemper B (1999) Association of holliday-structure resolving endonuclease VII with gp20 from the packaging machine of phage T4. *J Mol Biol* **285**: 1131-1144.

Griffith JD, Harris LD & Register J, 3rd (1984) Visualization of SSB-ssDNA complexes active in the assembly of stable RecA-DNA filaments. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **49**: 553-559.

Gual A, Camacho AG & Alonso JC (2000) Functional analysis of the terminase large subunit, G2P, of *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1. *J Biol Chem* **275**: 35311-35319.

Gutierrez C, Martin G, Sogo JM & Salas M (1991) Mechanism of stimulation of DNA replication by bacteriophage phi 29 single-stranded DNA-binding protein p5. *J Biol Chem* **266**: 2104-2111.

Haber JE (1999) DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci* **24**: 271-275.

- Haima P, Bron S & Venema G (1987) The effect of restriction on shotgun cloning and plasmid stability in *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol Gen Genet* **209**: 335-342.
- Han ES, Cooper DL, Persky NS, Suter VA, Jr., Whitaker RD, Montello ML & Lovett ST (2006) RecJ exonuclease: substrates, products and interaction with SSB. *Nucleic Acids Res* **34**: 1084-1091.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Helleday T, Lo J, van Gent DC & Engelward BP (2007) DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* **6**: 923-935.
- Heller RC & Marians KJ (2006) Replication fork reactivation downstream of a blocked nascent leading strand. *Nature* **439**: 557-562.
- Ishigo-Oka D, Ogasawara N & Moriya S (2001) DnaD protein of *Bacillus subtilis* interacts with DnaA, the initiator protein of replication. *J Bacteriol* **183**: 2148-2150.
- Iyer LM, Koonin EV & Aravind L (2002) Classification and evolutionary history of the single-strand annealing proteins, RecT, Redbeta, ERF and RAD52. *BMC Genomics* **3**: 8.
- Jakutyte L, Lurz R, Baptista C, Carballido-Lopez R, Sao-Jose C, Tavares P & Daugelavicius R (2012) First steps of bacteriophage SPP1 entry into *Bacillus subtilis*. *Virology* **422**: 425-434.
- Jones JM & Nakai H (1999) Duplex opening by primosome protein PriA for replisome assembly on a recombination intermediate. *J Mol Biol* **289**: 503-516.
- Kagawa W, Kurumizaka H, Ikawa S, Yokoyama S & Shibata T (2001) Homologous pairing promoted by the human Rad52 protein. *J Biol Chem* **276**: 35201-35208.
- Kelly TJ, Simanek P & Brush GS (1998) Identification and characterization of a single-stranded DNA-binding protein from the archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 14634-14639.
- Kelman Z, Yuzhakov A, Andjelkovic J & O'Donnell M (1998) Devoted to the lagging strand-the subunit of DNA polymerase III holoenzyme contacts SSB to promote processive elongation and sliding clamp assembly. *EMBO J* **17**: 2436-2449.
- Khan SA (2005) Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid* **53**: 126-136.
- Kim S, Dallmann HG, McHenry CS & Marians KJ (1996) Coupling of a replicative polymerase and helicase: a tau-DnaB interaction mediates rapid replication fork movement. *Cell* **84**: 643-650.
- Kinebuchi T, Shindo H, Nagai H, Shimamoto N & Shimizu M (1997) Functional domains of *Escherichia coli* single-stranded DNA binding protein as assessed by analyses of the deletion mutants. *Biochemistry* **36**: 6732-6738.
- Kong XP, Onrust R, O'Donnell M & Kuriyan J (1992) Three-dimensional structure of the beta subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell* **69**: 425-437.
- Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, *et al.* (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.
- Kuzminov A (1995) Instability of inhibited replication forks in *E. coli*. *Bioessays* **17**: 733-741.
- Langston LD & O'Donnell M (2006) DNA replication: keep moving and don't mind the gap. *Mol Cell* **23**: 155-160.
- Learn BA, Um SJ, Huang L & McMacken R (1997) Cryptic single-stranded-DNA binding activities of the phage lambda P and *Escherichia coli* DnaC replication initiation proteins facilitate the transfer of *E. coli* DnaB helicase onto DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1154-1159.
- LeBowitz JH & McMacken R (1986) The *Escherichia coli* dnaB replication protein is a DNA helicase. *J Biol Chem* **261**: 4738-4748.
- Lecointe F, Serena C, Velten M, *et al.* (2007) Anticipating chromosomal replication fork arrest: SSB targets repair DNA helicases to active forks. *EMBO J* **26**: 4239-4251.
- Lemon KP MS, Ogasawara N, Grossman AD (2002) Chromosome replication and segregation. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: From genes to cells. *Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R, editors*. 73-86.

Levine A, Henckes G, Vannier F & Seror SJ (1987) Chromosomal initiation in *Bacillus subtilis* may involve two closely linked origins. *Mol Gen Genet* **208**: 37-44.

Liberek K, Georgopoulos C & Zylicz M (1988) Role of the *Escherichia coli* DnaK and DnaJ heat shock proteins in the initiation of bacteriophage lambda DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 6632-6636.

Lilley DM & White MF (2001) The junction-resolving enzymes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 433-443.

Ling F & Shibata T (2004) Mhr1p-dependent concatemeric mitochondrial DNA formation for generating yeast mitochondrial homoplasmic cells. *Mol Biol Cell* **15**: 310-322.

Lioy VS, Pratto F, de la Hoz AB, Ayora S & Alonso JC (2010) Plasmid pSM19035, a model to study stable maintenance in Firmicutes. *Plasmid* **64**: 1-17.

Liu J & Marians KJ (1999) PriA-directed assembly of a primosome on D loop DNA. *J Biol Chem* **274**: 25033-25041.

Lloyd RG & Sharples GJ (1993) Dissociation of synthetic Holliday junctions by *E. coli* RecG protein. *EMBO J* **12**: 17-22.

Lo Piano A, Martinez-Jimenez MI, Zecchi L & Ayora S (2011) Recombination-dependent concatemeric viral DNA replication. *Virus Res* **160**: 1-14.

Lohman TM & Overman LB (1985) Two binding modes in *Escherichia coli* single strand binding protein-single stranded DNA complexes. Modulation by NaCl concentration. *J Biol Chem* **260**: 3594-3603.

Lohman TM & Ferrari ME (1994) *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein: multiple DNA-binding modes and cooperativities. *Annu Rev Biochem* **63**: 527-570.

Lohman TM, Overman LB & Datta S (1986) Salt-dependent changes in the DNA binding cooperativity of *Escherichia coli* single strand binding protein. *J Mol Biol* **187**: 603-615.

Lopes A, Amarir-Bouhram J, Faure G, Petit MA & Guerois R (2010) Detection of novel recombinases in bacteriophage genomes unveils Rad52, Rad51 and Gp2.5 remote homologs. *Nucleic Acids Res* **38**: 3952-3962.

Lu D & Keck JL (2008) Structural basis of *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein stimulation of exonuclease I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 9169-9174.

Lu YB, Ratnakar PV, Mohanty BK & Bastia D (1996) Direct physical interaction between DnaG primase and DnaB helicase of *Escherichia coli* is necessary for optimal synthesis of primer RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12902-12907.

Lurz R, Orlova EV, Gunther D, *et al.* (2001) Structural organisation of the head-to-tail interface of a bacterial virus. *J Mol Biol* **310**: 1027-1037.

Macmaster R, Sedelnikova S, Baker PJ, Bolt EL, Lloyd RG & Rafferty JB (2006) RusA Holliday junction resolvase: DNA complex structure--insights into selectivity and specificity. *Nucleic Acids Res* **34**: 5577-5584.

Mahdi AA, Sharples GJ, Mandal TN & Lloyd RG (1996) Holliday junction resolvases encoded by homologous *rusA* genes in *Escherichia coli* K-12 and phage 82. *J Mol Biol* **257**: 561-573.

Mandal TN, Mahdi AA, Sharples GJ & Lloyd RG (1993) Resolution of Holliday intermediates in recombination and DNA repair: indirect suppression of *ruvA*, *ruvB*, and *ruvC* mutations. *J Bacteriol* **175**: 4325-4334.

Manfredi C, Carrasco B, Ayora S & Alonso JC (2008) *Bacillus subtilis* RecO nucleates RecA onto SsbA-coated single-stranded DNA. *J Biol Chem* **283**: 24837-24847.

Marians KJ (2000) PriA-directed replication fork restart in *Escherichia coli*. *Trends Biochem Sci* **25**: 185-189.

Marians KJ (2004) Mechanisms of replication fork restart in *Escherichia coli*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**: 71-77.

Marszalek J & Kaguni JM (1994) DnaA protein directs the binding of DnaB protein in initiation of DNA replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **269**: 4883-4890.

- Martinez-Jimenez MI, Mesa P & Alonso JC (2002) Bacillus subtilis tau subunit of DNA polymerase III interacts with bacteriophage SPP1 replicative DNA helicase G40P. *Nucleic Acids Res* **30**: 5056-5064.
- Martinez-Jimenez MI, Alonso JC & Ayora S (2005) Bacillus subtilis bacteriophage SPP1-encoded gene 34.1 product is a recombination-dependent DNA replication protein. *J Mol Biol* **351**: 1007-1019.
- Masuda T, Ito Y, Terada T, Shibata T & Mikawa T (2009) A non-canonical DNA structure enables homologous recombination in various genetic systems. *J Biol Chem* **284**: 30230-30239.
- McHenry CS & Crow W (1979) DNA polymerase III of Escherichia coli. Purification and identification of subunits. *J Biol Chem* **254**: 1748-1753.
- McIntosh PK, Dunker R, Mulder C & Brown NC (1978) DNA of Bacillus subtilis bacteriophage SPP1: physical mapping and localization of the origin of replication. *J Virol* **28**: 865-876.
- Mesa P, Alonso JC & Ayora S (2006) Bacillus subtilis bacteriophage SPP1 G40P helicase lacking the n-terminal domain unwinds DNA bidirectionally. *J Mol Biol* **357**: 1077-1088.
- Meyer RR & Laine PS (1990) The single-stranded DNA-binding protein of Escherichia coli. *Microbiol Rev* **54**: 342-380.
- Michel B, Ehrlich SD & Uzzest M (1997) DNA double-strand breaks caused by replication arrest. *EMBO J* **16**: 430-438.
- Michel B, Grompone G, Flores MJ & Bidnenko V (2004) Multiple pathways process stalled replication forks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 12783-12788.
- Miller ES, Kutter E, Mosig G, Arisaka F, Kunisawa T & Ruger W (2003) Bacteriophage T4 genome. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 86-156, table of contents.
- Missich R, Weise F, Chai S, Lurz R, Pedre X & Alonso JC (1997) The replisome organizer (G38P) of Bacillus subtilis bacteriophage SPP1 forms specialized nucleoprotein complexes with two discrete distant regions of the SPP1 genome. *J Mol Biol* **270**: 50-64.
- Montenegro MA & Trautner TA (1981) In vivo transcription of Bacillus subtilis bacteriophage SPP1. *Mol Gen Genet* **181**: 512-517.
- Morelli G, Fisseau C, Behrens B, et al. (1979) The genome of B. subtilis phage SSP1: the topology of DNA molecules. *Mol Gen Genet* **168**: 153-161.
- Moriya S, Atlung T, Hansen FG, Yoshikawa H & Ogasawara N (1992) Cloning of an autonomously replicating sequence (ars) from the Bacillus subtilis chromosome. *Mol Microbiol* **6**: 309-315.
- Muyrers JP, Zhang Y, Buchholz F & Stewart AF (2000) RecE/RecT and Redalpha/Redbeta initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. *Genes Dev* **14**: 1971-1982.
- Narajczyk M, Baranska S, Wegrzyn A & Wegrzyn G (2007) Switch from theta to sigma replication of bacteriophage lambda DNA: factors involved in the process and a model for its regulation. *Mol Genet Genomics* **278**: 65-74.
- Naue N, Beerbaum M, Bogutzki A, Schmieder P & Curth U (2013) The helicase-binding domain of Escherichia coli DnaG primase interacts with the highly conserved C-terminal region of single-stranded DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res*.
- Nimonkar AV & Boehmer PE (2003) Reconstitution of recombination-dependent DNA synthesis in herpes simplex virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10201-10206.
- Noirot P & Kolodner RD (1998) DNA strand invasion promoted by Escherichia coli RecT protein. *J Biol Chem* **273**: 12274-12280.
- Noirot P, Gupta RC, Radding CM & Kolodner RD (2003) Hallmarks of homology recognition by RecA-like recombinases are exhibited by the unrelated Escherichia coli RecT protein. *EMBO J* **22**: 324-334.
- Noirot-Gros MF, Dervyn E, Wu LJ, Mervelet P, Errington J, Ehrlich SD & Noirot P (2002) An expanded view of bacterial DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8342-8347.

Novick RP, Edelman I & Lofdahl S (1986) Small *Staphylococcus aureus* plasmids are transduced as linear multimers that are formed and resolved by replicative processes. *J Mol Biol* **192**: 209-220.

Nunez-Ramirez R, Velten M, Rivas G, Polard P, Carazo JM & Donate LE (2007) Loading a ring: structure of the *Bacillus subtilis* DnaB protein, a co-loader of the replicative helicase. *J Mol Biol* **367**: 764-769.

Nurse P, Liu J & Mariani KJ (1999) Two modes of PriA binding to DNA. *J Biol Chem* **274**: 25026-25032.

Oldenburg DJ & Bendich AJ (2004) Most chloroplast DNA of maize seedlings in linear molecules with defined ends and branched forms. *J Mol Biol* **335**: 953-970.

Oliveira L, Cuervo A & Tavares P (2010) Direct interaction of the bacteriophage SPP1 packaging ATPase with the portal protein. *J Biol Chem* **285**: 7366-7373.

Orlova EV, Gowen B, Droge A, *et al.* (2003) Structure of a viral DNA gatekeeper at 10 Å resolution by cryo-electron microscopy. *EMBO J* **22**: 1255-1262.

Overman LB & Lohman TM (1994) Linkage of pH, anion and cation effects in protein-nucleic acid equilibria. *Escherichia coli* SSB protein-single stranded nucleic acid interactions. *J Mol Biol* **236**: 165-178.

Pant K, Shokri L, Karpel RL, Morrical SW & Williams MC (2008) Modulation of T4 gene 32 protein DNA binding activity by the recombination mediator protein UvsY. *J Mol Biol* **380**: 799-811.

Passy SI, Yu X, Li Z, Radding CM & Egelman EH (1999) Rings and filaments of beta protein from bacteriophage lambda suggest a superfamily of recombination proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 4279-4284.

Pedre X, Weise F, Chai S, Luder G & Alonso JC (1994) Analysis of cis and trans acting elements required for the initiation of DNA replication in the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1. *J Mol Biol* **236**: 1324-1340.

Pohjoismaki JL, Goffart S, Tyynismaa H, *et al.* (2009) Human heart mitochondrial DNA is organized in complex catenated networks containing abundant four-way junctions and replication forks. *J Biol Chem* **284**: 21446-21457.

Rafferty JB, Bolt EL, Muranova TA, *et al.* (2003) The structure of *Escherichia coli* RuvA endonuclease reveals a new Holliday junction DNA binding fold. *Structure* **11**: 1557-1567.

Raghuathan S, Ricard CS, Lohman TM & Waksman G (1997) Crystal structure of the homotetrameric DNA binding domain of *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein determined by multiwavelength x-ray diffraction on the selenomethionyl protein at 2.9-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 6652-6657.

Rannou O, Le Chatelier E, Larson MA, *et al.* (2013) Functional interplay of DnaE polymerase, DnaG primase and DnaC helicase within a ternary complex, and primase to polymerase hand-off during lagging strand DNA replication in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.*

Reuven NB, Antoku S & Weller SK (2004) The UL12.5 gene product of herpes simplex virus type 1 exhibits nuclease and strand exchange activities but does not localize to the nucleus. *J Virol* **78**: 4599-4608.

Reuven NB, Staire AE, Myers RS & Weller SK (2003) The herpes simplex virus type 1 alkaline nuclease and single-stranded DNA binding protein mediate strand exchange in vitro. *J Virol* **77**: 7425-7433.

Riva S, Polsinelli M & Falaschi A (1968) A new phage of *Bacillus subtilis* with infectious DNA having separable strands. *J Mol Biol* **35**: 347-356.

Rowen L & Kornberg A (1978) Primase, the dnaG protein of *Escherichia coli*. An enzyme which starts DNA chains. *J Biol Chem* **253**: 758-764.

Roy R, Kozlov AG, Lohman TM & Ha T (2007) Dynamic structural rearrangements between DNA binding modes of *E. coli* SSB protein. *J Mol Biol* **369**: 1244-1257.

- Sadowski PD (1974) Suppression of a mutation in gene 3 of bacteriophage T7 (T7 endonuclease I) by mutations in phage and host polynucleotide ligase. *J Virol* **13**: 226-229.
- Sambrook J, Fritsch E. F., and Maniatis (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *New York*.
- San Martin MC, Stamford NP, Dammerova N, Dixon NE & Carazo JM (1995) A structural model for the Escherichia coli DnaB helicase based on electron microscopy data. *J Struct Biol* **114**: 167-176.
- Sanders GM, Dallmann HG & McHenry CS (2010) Reconstitution of the B. subtilis replisome with 13 proteins including two distinct replicases. *Mol Cell* **37**: 273-281.
- Sanjanwala B & Ganesan AT (1989) DNA polymerase III gene of Bacillus subtilis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 4421-4424.
- Sanjanwala B & Ganesan AT (1991) Genetic structure and domains of DNA polymerase III of Bacillus subtilis. *Mol Gen Genet* **226**: 467-472.
- Sawitzke JA & Stahl FW (1992) Phage lambda has an analog of Escherichia coli recO, recR and recF genes. *Genetics* **130**: 7-16.
- Schaper S & Messer W (1995) Interaction of the initiator protein DnaA of Escherichia coli with its DNA target. *J Biol Chem* **270**: 17622-17626.
- Seco EM, Zinder JC, Manhart CM, Lo Piano A, McHenry CS & Ayora S (2013) Bacteriophage SPP1 DNA replication strategies promote viral and disable host replication in vitro. *Nucleic Acids Res* **41**: 1711-1721.
- Seigneur M, Bidnenko V, Ehrlich SD & Michel B (1998) RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell* **95**: 419-430.
- Shamoo Y, Friedman AM, Parsons MR, Konigsberg WH & Steitz TA (1995) Crystal structure of a replication fork single-stranded DNA binding protein (T4 gp32) complexed to DNA. *Nature* **376**: 362-366.
- Sharples GJ, Corbett LM & Graham IR (1998) lambda Rap protein is a structure-specific endonuclease involved in phage recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13507-13512.
- Sharples GJ, Corbett LM & McGlynn P (1999) DNA structure specificity of Rap endonuclease. *Nucleic Acids Res* **27**: 4121-4127.
- Sharples GJ, Bolt EL & Lloyd RG (2002) RusA proteins from the extreme thermophile Aquifex aeolicus and lactococcal phage rlt resolve Holliday junctions. *Mol Microbiol* **44**: 549-559.
- Sharples GJ, Curtis FA, McGlynn P & Bolt EL (2004) Holliday junction binding and resolution by the Rap structure-specific endonuclease of phage lambda. *J Mol Biol* **340**: 739-751.
- Sharples GJ, Chan SN, Mahdi AA, Whitby MC & Lloyd RG (1994) Processing of intermediates in recombination and DNA repair: identification of a new endonuclease that specifically cleaves Holliday junctions. *EMBO J* **13**: 6133-6142.
- Sharpless NE, Ferguson DO, O'Hagan RC, *et al.* (2001) Impaired nonhomologous end-joining provokes soft tissue sarcomas harboring chromosomal translocations, amplifications, and deletions. *Mol Cell* **8**: 1187-1196.
- Shereda RD, Bernstein DA & Keck JL (2007) A central role for SSB in Escherichia coli RecQ DNA helicase function. *J Biol Chem* **282**: 19247-19258.
- Shereda RD, Kozlov AG, Lohman TM, Cox MM & Keck JL (2008) SSB as an organizer/mobilizer of genome maintenance complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **43**: 289-318.
- Shutt TE & Gray MW (2006) Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. *Trends Genet* **22**: 90-95.
- Simmons LA, Grossman AD & Walker GC (2007) Replication is required for the RecA localization response to DNA damage in Bacillus subtilis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 1360-1365.
- Skalka AM (1977) DNA replication--bacteriophage lambda. *Curr Top Microbiol Immunol* **78**: 201-237.

Soultanas P (2005) The bacterial helicase-primase interaction: a common structural/functional module. *Structure* **13**: 839-844.

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.

Strang BL & Stow ND (2005) Circularization of the herpes simplex virus type 1 genome upon lytic infection. *J Virol* **79**: 12487-12494.

Stuber D, Morelli G, Bujard H, Montenegro MA & Trautner TA (1981) Promoter sites in the genome of B. subtilis phage SPP1. *Mol Gen Genet* **181**: 518-521.

Studier FW, Daegelen P, Lenski RE, Maslov S & Kim JF (2009) Understanding the differences between genome sequences of Escherichia coli B strains REL606 and BL21(DE3) and comparison of the E. coli B and K-12 genomes. *J Mol Biol* **394**: 653-680.

Sung P, Krejci L, Van Komen S & Sehorn MG (2003) Rad51 recombinase and recombination mediators. *J Biol Chem* **278**: 42729-42732.

Szczepanska AK (2009) Bacteriophage-encoded functions engaged in initiation of homologous recombination events. *Crit Rev Microbiol* **35**: 197-220.

Tailor R, Bensi G, Morelli G, Canosi U & Trautner TA (1985) The genome of Bacillus subtilis phage SPP1: structure of an early promoter. *J Gen Microbiol* **131**: 1259-1262.

Tavares P, Lurz R, Stiege A, Ruckert B & Trautner TA (1996) Sequential headful packaging and fate of the cleaved DNA ends in bacteriophage SPP1. *J Mol Biol* **264**: 954-967.

Taylor K & Wegrzyn G (1995) Replication of coliphage lambda DNA. *FEMS Microbiol Rev* **17**: 109-119.

Thirlway J & Soultanas P (2006) In the Bacillus stearothermophilus DnaB-DnaG complex, the activities of the two proteins are modulated by distinct but overlapping networks of residues. *J Bacteriol* **188**: 1534-1539.

Thomas MS, Gao M, Knipe DM & Powell KL (1992) Association between the herpes simplex virus major DNA-binding protein and alkaline nuclease. *J Virol* **66**: 1152-1161.

Thresher RJ, Makhov AM, Hall SD, Kolodner R & Griffith JD (1995) Electron microscopic visualization of RecT protein and its complexes with DNA. *J Mol Biol* **254**: 364-371.

Tippin B, Kobayashi S, Bertram JG & Goodman MF (2004) To slip or skip, visualizing frameshift mutation dynamics for error-prone DNA polymerases. *J Biol Chem* **279**: 45360-45368.

Tougu K, Peng H & Marians KJ (1994) Identification of a domain of Escherichia coli primase required for functional interaction with the DnaB helicase at the replication fork. *J Biol Chem* **269**: 4675-4682.

Umez K & Kolodner RD (1994) Protein interactions in genetic recombination in Escherichia coli. Interactions involving RecO and RecR overcome the inhibition of RecA by single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem* **269**: 30005-30013.

Vasantha N & Freese E (1979) The role of manganese in growth and sporulation of Bacillus subtilis. *J Gen Microbiol* **112**: 329-336.

Vellani TS & Myers RS (2003) Bacteriophage SPP1 Chu is an alkaline exonuclease in the SynExo family of viral two-component recombinases. *J Bacteriol* **185**: 2465-2474.

Velten M, McGovern S, Marsin S, Ehrlich SD, Noirot P & Polard P (2003) A two-protein strategy for the functional loading of a cellular replicative DNA helicase. *Mol Cell* **11**: 1009-1020.

Viret JF & Alonso JC (1987) Generation of linear multigenome-length plasmid molecules in Bacillus subtilis. *Nucleic Acids Res* **15**: 6349-6367.

Wahle E, Lasken RS & Kornberg A (1989) The dnaB-dnaC replication protein complex of Escherichia coli. II. Role of the complex in mobilizing dnaB functions. *J Biol Chem* **264**: 2469-2475.

Wang G, Klein MG, Tokonzaba E, Zhang Y, Holden LG & Chen XS (2008) The structure of a DnaB-family replicative helicase and its interactions with primase. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 94-100.

- Wegrzyn G & Wegrzyn A (2005) Genetic switches during bacteriophage lambda development. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **79**: 1-48.
- Weigel C & Seitz H (2006) Bacteriophage replication modules. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 321-381.
- Weigelt J, Brown SE, Miles CS, Dixon NE & Otting G (1999) NMR structure of the N-terminal domain of E. coli DnaB helicase: implications for structure rearrangements in the helicase hexamer. *Structure* **7**: 681-690.
- Weise F, Chai S, Luder G & Alonso JC (1994) Nucleotide sequence and complementation studies of the gene 35 region of the Bacillus subtilis bacteriophage SPP1. *Virology* **202**: 1046-1049.
- Whitby MC, Ryder L & Lloyd RG (1993) Reverse branch migration of Holliday junctions by RecG protein: a new mechanism for resolution of intermediates in recombination and DNA repair. *Cell* **75**: 341-350.
- White MF (2011) Homologous recombination in the archaea: the means justify the ends. *Biochem Soc Trans* **39**: 15-19.
- Wilkinson DE & Weller SK (2003) The role of DNA recombination in herpes simplex virus DNA replication. *IUBMB Life* **55**: 451-458.
- Witte G, Urbanke C & Curth U (2003) DNA polymerase III chi subunit ties single-stranded DNA binding protein to the bacterial replication machinery. *Nucleic Acids Res* **31**: 4434-4440.
- Wolf P (1982) A Critical Reappraisal of Waddell's Technique for Ultraviolet Spectrophotometric Protein Estimation. *Analytical Biochemistry* **129**: 145-155.
- Wu Z, Xing X, Bohl CE, Wisler JW, Dalton JT & Bell CE (2006) Domain structure and DNA binding regions of beta protein from bacteriophage lambda. *J Biol Chem* **281**: 25205-25214.
- Xu H, Beernink HT & Morrical SW (2010) DNA-binding properties of T4 UvsY recombination mediator protein: polynucleotide wrapping promotes high-affinity binding to single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* **38**: 4821-4833.
- Xu L & Marians KJ (2000) Purification and characterization of DnaC810, a primosomal protein capable of bypassing PriA function. *J Biol Chem* **275**: 8196-8205.
- Yadav T, Carrasco B, Myers AR, George NP, Keck JL & Alonso JC (2012) Genetic recombination in Bacillus subtilis: a division of labor between two single-strand DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* **40**: 5546-5559.
- Yasbin RE & Young FE (1974) Transduction in Bacillus subtilis by bacteriophage SPP1. *J Virol* **14**: 1343-1348.
- Yasbin RE, Fields PI & Andersen BJ (1980) Properties of Bacillus subtilis 168 derivatives freed of their natural prophages. *Gene* **12**: 155-159.
- Yuzhakov A, Kelman Z & O'Donnell M (1999) Trading places on DNA--a three-point switch underlies primer handoff from primase to the replicative DNA polymerase. *Cell* **96**: 153-163.
- Zecchi L, Lo Piano A, Suzuki Y, Canas C, Takeyasu K & Ayora S (2012) Characterization of the Holliday junction resolving enzyme encoded by the Bacillus subtilis bacteriophage SPP1. *PLoS One* **7**: e48440.
- Zechner EL, Wu CA & Marians KJ (1992) Coordinated leading- and lagging-strand synthesis at the Escherichia coli DNA replication fork. II. Frequency of primer synthesis and efficiency of primer utilization control Okazaki fragment size. *J Biol Chem* **267**: 4045-4053.
- Zsigray RM, Miss AL & Landman OE (1973) Penetration of a bacteriophage into Bacillus subtilis: blockage of infection by deoxyribonuclease. *J Virol* **11**: 69-77.
- Zzaman S & Bastia D (2005) Oligomeric initiator protein-mediated DNA looping negatively regulates plasmid replication in vitro by preventing origin melting. *Mol Cell* **20**: 833-843.

ABREVIATURAS

aa: aminoácido

BSA: seroalbúmina bovina (del inglés, siglas *Bovine Serum Albumin*)

c.p.m.: cuentas por minuto

DNA: ácido desoxiribonucleico

dNTP: desoxiribonucleótidos trifosfato

rNTP: ribonucleótidos trifostato

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilen diamino tetraacético

h: horas

IPTG: isopropilo- β -D-tiogalactósido

K_{app}: Constante de unión aparente (concentración de proteína que da lugar a una saturación del 50% del DNA)

LB: medio de cultivo Luria Bertani

min: minuto

moi.: multiplicidad de infección (del inglés, siglas *multiplicity of infection*)

OD: densidad óptica (del inglés, siglas *Optical Density*)

ORF: fase de lectura abierta (del inglés, siglas *Open Reading Frame*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, siglas *Polymerase Chain Reaction*)

PEI: polietilenimina

RNA: ácido ribonucleico

rpm.: revoluciones por minuto

PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida (del inglés, siglas *PolyAcrilamide Gel Electrophoresis*)

SDS: dodecil sulfato sódico (del ingles, siglas *Sodium Dodecyl Sulphate*)

wt: tipo salvaje o silvestre (del inglés, siglas *wild type*)

AGRADECIMIENTOS (RINGRAZIAMENTI)

Esta tesis ha sido realizada gracias a un contrato de Personal Investigador de Apoyo concedido por la Comunidad de Madrid.

Quisiera agradecer mis directores de tesis, la Dra. Silvia Ayora y el Dr. Juan Carlos Alonso por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral.

Al Dr. Rudi Lurz del centro Max Planck-Institut für Molekulare Genetik, por haberme recibido en su laboratorio y ayudado con el uso del microscopio electrónico.

A la Licenciada Lisa Zecchi y a la Dra. Elena Seco para haber contribuido en el desarrollo de este proyecto.

A mis ex-compañeras de laboratorio Cris, María, Esther, Rosa, Ana, Marta y Gabi por compartir alegrías, tristezas, problemas, proyectos... Gracias por escucharme, apoyarme y motivarme.

A los compañeros del laboratorio 214 y al personal del CNB. Gracias a todas aquellas personas que con solo una sonrisa por el pasillo rendían agradable las horas de trabajo.

Alla mia famiglia. A mia madre che so che sarà orgogliosa di me e a mio padre che sarà felice per me, incondizionalmente. Ai miei nonni, ai miei zii e a miei cugini, nonostante la lontananza, ho sentito costantemente il vostro appoggio. Un grazie particolare a Stella per essermi sempre stata vicino.

A Dani, por soportarme en los momentos difíciles, por apoyarme en mis decisiones, por ayudarme a encarar con optimismo mis fracasos.

A todas la personas con las que he compartido estos seis años en España, mi más sincero agradecimiento. Gracias, Ivan, Anna, Inma, Paula y Elena por apoyarme en todo momento.